

DOSSIER DE CANDIDATURE AU DIPLOME D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

De

L'UNIVERSITE MONTPELLIER II ECOLE DOCTORALE SIBAGHE

Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences,
Environnement
Présenté par

Christophe Périn

UMR AGAP CIRAD-INRA-SUPAGRO
Amélioration génétique et adaptation des plantes méditerranéennes et tropicales

Sommaire

1	Travaux antérieurs à 2002	4
1.1	Avant propos	4
1.2	Travaux antérieurs à la thèse	4
1.2.1	Variabilité au niveau moléculaire d'un champignon endomycorhizien 1995	4
1.2.2	Protéines pariétales induites par la sécheresse chez le maïs 1996.....	4
1.3	Travaux de thèse : Construction d'une carte génétique de référence et étude du contrôle génétique du développement et de la maturation chez le melon (<i>Cucumis melo L.</i>) 1997-2000	5
1.3.1	Une carte génétique de référence de <i>Cucumis melo L.</i>	5
1.3.2	La forme des fruits est sous le contrôle de QTLs de développement de l'ovaire	7
1.3.3	Le contrôle génétique de la maturation des fruits est complexe	8
1.3.4	Conclusion	8
1.4	Travaux de post-doctorat	9
1.4.1	La famille de gènes à domaine MADS chez la tomate 2000-2001	9
1.4.2	Caractérisation fonctionnelle des P-Atpases HMA chez <i>A. thaliana</i> 2001-2002	13
2	Travaux depuis mon embauche au CIRAD 2002-2011	14
2.1	Le défi posé par le séquençage du génome du riz	14
2.2	Faire du riz l'espèce modèle des monocotylédones 2002-2008.....	14
2.2.1	Génétique inverse chez le riz: OryGenesDB (ODB)	15
2.2.2	Transfert d'annotations entre espèces : GreenPhylDB (GDB)	15
2.3	Architecture racinaire et développement.....	16
2.3.1	Tissus internes racinaires et conditions de vie semi-aquatique chez le riz.....	16
2.3.2	Anatomie et morphologie racinaire du riz : mise en place des tissus internes.....	17
2.3.3	SCR et SHR contrôlent la mise en place des tissus internes chez <i>A. thaliana</i>	22
2.3.4	Rôle OsSHR1 et d'OsSHR2 dans la mise en place des couches de cortex	24
3	Projet : Les cellules souches racinaires des tissus internes et le développement adaptatif racinaire chez le riz	33
3.1	Cellules souches, identité cellulaire et divisions formatives	33
3.2	Evo–devo des gènes impliqués dans la formation des tissus internes	34
3.2.1	Fonction des couples de co-orthologues OsSHR1/2 et OsSCR1/2	34
3.2.2	Autres membres du réseau SCR/SHR chez le riz	35

3.2.3	Modifications géniques ciblés : la chirurgie génique grâce aux TALEN.....	35
3.3	Signaux de différenciation et cellules souches des tissus internes	39
3.3.1	Signaux de différenciation des tissus internes de la racine	39
3.3.2	Promoteurs et lignées enhancer trap spécifiques des tissus internes de la racine	40
3.3.3	Technologie INTACT (Isolation of Nuclei TAgged in specific Cell Types)	41
3.3.4	Les acteurs clefs de la différenciation radiale : communications cellule à cellule	45
3.4	Cellules souches et tissus internes : plasticité phénotypique	47
3.4.1	Rôle de l'auxine dans l'apparition de grandes versus petites racines latérales.....	47
3.4.2	Origines nutritionnelles et/ou hormonales des différences de diamètre racinaires	48
3.4.3	Réponses adaptatives cellulaires spécifiques des tissus internes racinaires	49
3.5	Vers la biologie des systèmes: modélisation et sélection	49
4	Curriculum vitae.....	50
5	Publications	52
5.1	Bilan synthétique.....	52
5.2	Liste des publications dans des revues de rang A	53
5.3	Ouvrages ou chapitre d'ouvrage	55
6	Résumé des activités d'encadrement	56
7	References	57

1 Travaux antérieurs à 2002

1.1 Avant propos

Les travaux les plus anciens datant de 1995, j'ai cherché à replacer tous ces travaux de recherche dans le contexte de l'époque. Par ailleurs, j'ai également cherché si certains des résultats obtenus avaient trouvé une conclusion dans la bibliographie récente.

1.2 Travaux antérieurs à la thèse

1.2.1 Variabilité au niveau moléculaire d'un champignon endomycorhizien 1995

L'absence de reproduction sexuée chez certaines espèces de *Glomus*, champignons endomycorhyziens chez la plante a conduit à l'époque à s'interroger sur le niveau de diversité existant dans une souche du champignon *Glomus intraradices*. L'hypothèse était qu'une souche de *Glomus* est en fait constituée de populations de noyaux génétiquement différents. Mon stage de maîtrise a contribué à tester en partie cette hypothèse en utilisant des amorces conservées amplifiant l'ITS1, une séquence intergénique positionnée entre les séquences codantes pour les ARNr 18s et 5.8s. Elle était et est toujours classiquement utilisée comme indicateur taxonomique inter et intra espèce. J'ai démontré qu'il existait une variabilité de taille pour ITS1 et que cette variabilité de taille co-existait dans différentes souches de *G. intraradices*, renforçant l'idée que chaque souche de *G. intraradices* était formée d'un syncytium contenant une population de noyaux génétiquement différents qui se reproduisent par division mitotiques. Cette hypothèse a été démontrée depuis [1].

1.2.2 Protéines pariétales induites par la sécheresse chez le maïs 1996

L'augmentation et la diminution de la synthèse de protéines de parois en réponse à un stress hydrique avait été mise en évidence dans l'équipe de M. Zivy chez le maïs [2, 3]. J'ai contribué à développer une technique d'extraction de protéines pariétales afin d'obtenir à la fois un bon niveau de purification (exclusion des protéines nucléaires et cytoplasmiques) et un rendement d'extraction suffisant dans le cadre de mon sujet de stage de DEA.

J'ai également démontré que ce protocole permettait d'obtenir, avec une quantité faible de matériel de départ et de manière répétable, une vingtaine de spots visibles en gel bidimensionnel. Le spot de la Rubisco, n'est plus visible sur le gel de protéines pariétales confirmant que le protocole élimine le contenu cytoplasmique des cellules. Après un stress de 10 jours, les comparaisons entre témoin et stressés ont permis de mettre en évidence 3 spots, présents chez le stressé et absent chez le témoin confirmant qu'un stress hydrique induit la surexpression de protéines de parois chez le maïs.

1.3 Travaux de thèse : Construction d'une carte génétique de référence et étude du contrôle génétique du développement et de la maturation chez le melon (*Cucumis melo* L.) 1997-2000

Avant ma thèse, très peu de travaux de génétique moléculaire avaient été menés sur le melon, espèce considérée d'intérêt secondaire malgré son importance agronomique. Aucun QTL n'avait été localisé et une seule carte partielle existait [4]. Cette thèse avait pour objectif la création d'outils de génétique moléculaire (cartes génétiques) et l'utilisation de ces outils pour analyser le contrôle génétique de caractères liés au développement et à la maturation du fruit de melon. Ce travail s'est appuyé sur deux populations de RIL (Recombinant Inbred Lines) créés grâce à trois cultivars très contrastés, ce qui a facilité à la fois la cartographie génétique et l'étude du contrôle génétique de nombreux caractères. Après la création de ces outils, j'ai analysé le contrôle génétique de la morphologie du fruit à l'aide d'une approche de génétique quantitative. Puis, grâce à une approche combinant génétique, biologie moléculaire et physiologie, j'ai caractérisé un mutant de maturation du fruit et formulé des hypothèses sur le déterminisme moléculaire de ce mutant.

1.3.1 Une carte génétique de référence de *Cucumis melo* L.

La construction d'une première carte génétique nous a permis de valider l'utilisation de marqueurs de type PCR pour la construction de cartes génétiques : AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) [5] et IMA (Inter Microsatellite Amplification)[6]. Ces deux technologies génèrent un grand nombre de marqueurs à partir d'un nombre limité de combinaisons d'amorces. Ils ne provoquent pas l'effet de regroupements massifs dans les zones centromériques observés par exemple pour les AFLPs chez les Solanacées [7]. Leur répartition est complémentaire, les marqueurs IMA marquant des zones du génome pauvres en AFLP et réciproquement. Enfin, les marqueurs moléculaires AFLP et IMA génèrent des marqueurs permettant de relier plusieurs cartes génétiques (**Figure 1**). Chez le melon, comme chez de nombreuses espèces, les marqueurs de type AFLP marquent les mêmes régions du génome dans différents croisements ce qui a permis de confirmer l'alignement des deux cartes et de construire une carte consensus comprenant plus de 700 loci distincts [8].

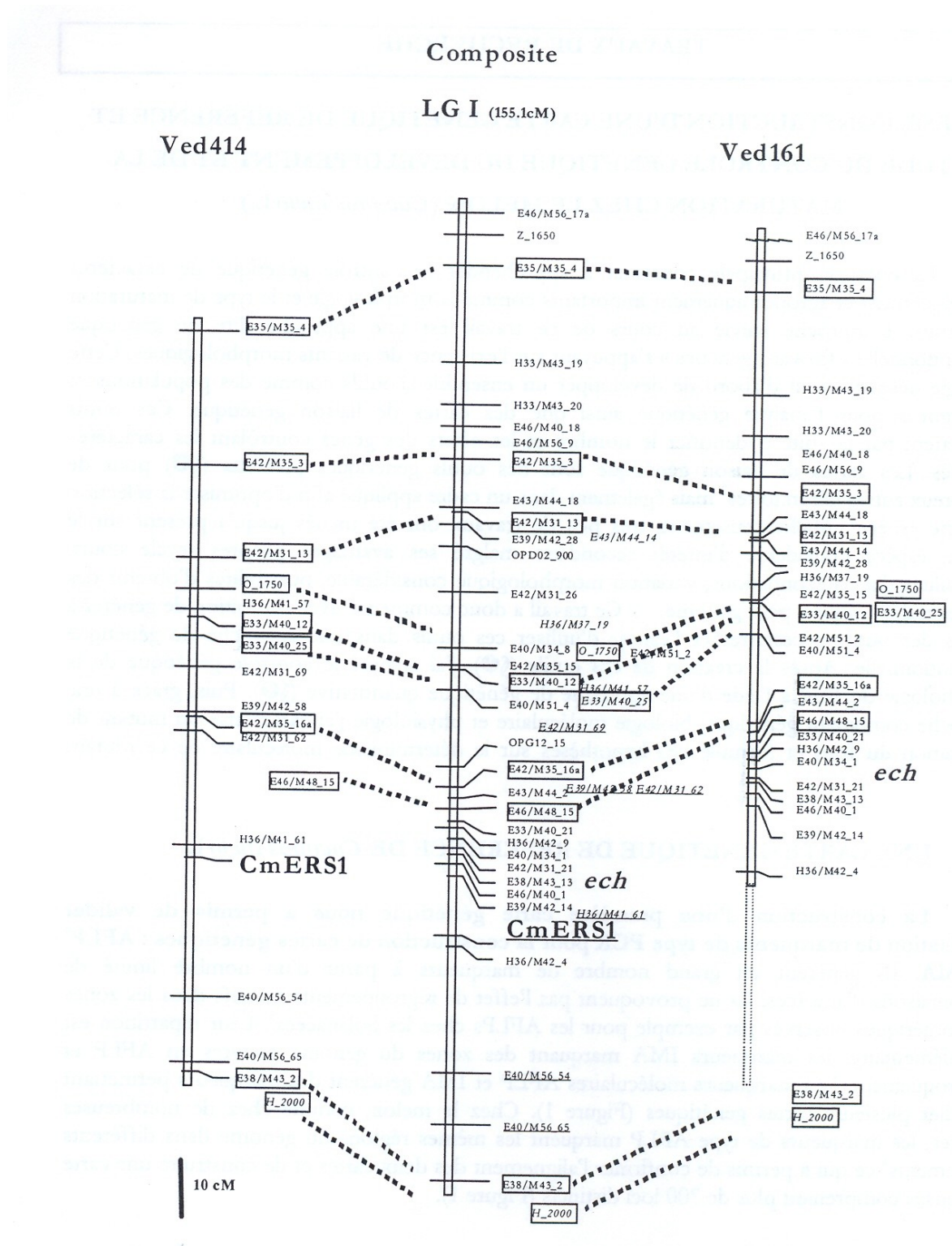


Figure 1. Groupe de liaison I de la carte du melon : Alignement des cartes Védrantais x PI161375 (droite), Védrantais x PI414723 (gauche) et composite (centre). Les marqueurs moléculaires communs aux deux populations et utilisés pour générer la carte consensus sont reliés par des lignes pointillées et sont représentés à l'intérieur d'un cadre. La carte composite comprend 12 groupes de liaison correspondants aux 12 chromosomes de l'espèce.

La carte consensus couvre une distance génétique de 1600 cM, supérieure à la couverture de chacune des deux cartes séparées [8]. A l'aide de ces deux cartes, j'ai pu localiser 23 gènes majeurs à hérédité mendélienne dont certains, les gènes de résistance à des agents pathogènes ou de qualité du fruit, contrôlent des caractères agronomiques importants. En particulier, 8 concernent la morphologie du fruit. Par exemple, le gène *gf* (green flesh) qui détermine la couleur de la chair (orange ou verte). Huit gènes de résistance à différents agents pathogènes d'importance économique chez le melon ont également pu être localisés [8]. Enfin, parmi les autres gènes positionnés, 2 gènes déterminent la morphologie florale. La présence du gène *andromonoecie* (*a*) entraîne la disparition de fleurs parfaites et les plantes résultantes sont monoïques [8].

1.3.2 La forme des fruits est sous le contrôle de QTLs de développement de l'ovaire

Des gènes exprimés précocement lors du développement de l'ovaire sont principalement responsables des variations de forme du fruit [9]. Quasiment tous les QTLs (gènes à effet partiel) contrôlant la forme du fruit co-localisent avec les QTLs contrôlant la forme des ovaires sur la carte génétique. Deux interprétations sont possibles, soit il existe une liaison génétique entre deux types de QTL, l'un agissant au stade de l'ovaire l'autre au stade fruit, ou bien une seule classe de gènes s'exprimant au cours du développement de l'ovaire a un effet pléiotropique tardif sur la forme du fruit. Sous l'hypothèse de liaison, on ne devrait pas retrouver de corrélation pour la forme entre le stade ovaire et fruit pour un ensemble de lignées génétiquement non apparentées. Or, il existe une très forte corrélation, pour 14 lignées [9]. De plus, deux gènes exprimés au stade fleur, *p* (pentamère) qui modifie le nombre de loges carpellaires et *a* (*andre/monoécie*) qui entraîne la présence de fleurs femelles, ont un effet sur la forme des fruits [9]. L'ensemble de ces résultats rejoignent et généralisent les résultats des pionniers comme Sinnot et Kaiser [10] ainsi que des résultats plus récents [9 , 11 , 12], qui démontre que la forme de l'ovaire prédispose la forme du fruit.

1.3.3 Le contrôle génétique de la maturation des fruits est complexe

L'étude d'un mutant de melon non mûrissant, PI161375, a permis de montrer que ce phénotype de non maturation était dû à une altération dans la perception / transduction du signal de l'éthylène, hormone responsable de la maturation [13]. Le traitement du parent non mûrissant, Védrantais, avec du propylène, qui induit la maturation du fruit chez la lignée témoin, n'induit pas la maturation du fruit chez le mutant, alors que le fruit de cette lignée est capable de produire de l'éthylène en réponse à un autre signal, la blessure [13]. La descendance issue du croisement issu de la lignée non mûrissante et non mûrissante a permis de montrer que deux gènes dupliqués (*A/3* et *A/4*) contrôlent qualitativement la présence ou l'absence d'un pic d'éthylène et la maturation [13]. L'analyse quantitative de la production d'éthylène au moment de la maturation a permis de mettre en évidence également 4 gènes modificateurs. Un dernier résultat, totalement inattendu, a permis de montrer que la plantule de PI161375 était hypersensible à l'éthylène bien que les fruits de la même lignée étaient insensibles à l'éthylène ! Ce phénotype est sous le contrôle d'un gène récessif (*ech*) qui co-localise avec un des gènes modificateurs, un QTL nommé *eth1.1*. De façon inattendue, le lien de la sensibilité à l'éthylène entre différents tissus est retrouvé sous la forme d'une co-localisation entre un QTL de production d'éthylène et un gène d'hypersensibilité à l'éthylène de la plantule étiolée [13].

1.3.4 Conclusion

De nombreux outils ont été développés, cartes génétiques, marqueurs encadrant des gènes majeurs, lignées isogéniques qui ont et auront une importance considérable aussi bien pour les travaux scientifiques futurs, par exemple le clonage positionnel de gènes d'intérêt, que sur le plan appliqué en particulier pour la sélection assistée par marqueurs. Prenant appui sur mon travail, les gènes VAT (virus Aphid Transmission) [14], nsV (necrotic virus) [15] et a (adromonoïque) [16] ont été isolés par clonage positionnel chez le melon, dans le cadre d'une collaboration entre l'URGV INRA Evry et l'INRA GAFL Avignon, mon laboratoire de thèse. Enfin, prenant appui sur mon travail une carte consensus comprenant 8 cartes génétiques et environ 1600 marqueurs vient d'être publiée [17].

1.4 Travaux de post-doctorat

1.4.1 La famille de gènes à domaine MADS chez la tomate 2000-2001

Le mutant de maturation du fruit de tomate *rin* (ripening inhibitor) a été isolé par clonage positionnel dans le laboratoire de J. Giovannoni et code pour un membre de la famille des facteurs de transcription à domaine MADS [18]. La mutation est en fait une délétion qui touche deux gènes à domaine MADS, les gènes *mcx* et *rin* [18]. A mon arrivée au laboratoire, j'ai essayé de répondre principalement à deux questions : Existe-t-il d'autres membres de cette famille chez la tomate jouant un rôle dans le développement des fruits ? Quels sont leurs relations phylogénétiques avec les gènes de cette famille chez *A. thaliana* ?

1.4.1.1 : Les facteurs de transcription à domaine MADS se regroupent en deux lignées

Deux grandes familles et 8 clades ont été identifiés à partir du domaine protéique MADS. Toutes les analyses de phylogénie moléculaire ont été faites à partir des séquences complètes en ajoutant un échantillon représentatif des grandes familles obtenues sur GenBank. Quatre séquences font partie de la lignée I et les 28 autres de la lignée II, deux lignées monophylétiques de la famille MADS issues d'une duplication précédant l'apparition de la lignée verte, comprenant les algues vertes et les plantes terrestres [19]. La lignée I se caractérise par la présence d'un domaine MADS du type SRP-like. Les autres séquences font partie de la lignée II et possèdent un domaine MADS de type MEF2-like ainsi que, dans le règne végétal d'un domaine protéique dit domaine K, nécessaire à la formation de complexes multimériques [20].

1.4.1.2 Deux clades ont connu une expansion importante chez la tomate

Un arbre enraciné avec des séquences de la lignée I comprenant les 27 gènes à domaine MADS isolés chez la tomate a été construit et a permis de séparer sans ambiguïté l'ensemble en 8 clades correspondant aux grandes familles connues par ailleurs [21].

1.4.1.2.1 Le clade AP1 FRUITFULL possède des paralogues spécifiques chez la tomate

La première super-famille est constituée de trois paralogues *CAL*, *AP1* et *FUL* chez *A. thaliana*. Ces trois paralogues ont une fonction redondante dans le maintien de l'intégrité du méristème [22]. Par ailleurs, *AP1* est nécessaire au développement des sépales [23] tandis que *FUL* est essentiel à la différenciation de la silique [24]. Si le gène *MCX* est clairement l'orthologue de *AP1* chez la tomate [18], il existe au moins 3 paralogues de *FUL* chez la tomate contre un seul chez *A. thaliana*: (**Figure 3A**) démontrant que cette sous-famille est en expansion chez la tomate et les Solanacées. Une copie fonctionnelle de *FUL* est nécessaire à la différenciation de la silique chez *A. thaliana* et de la capsule chez *Antirrhinum majus* [25]. Ceci confirme l'hypothèse que ces trois paralogues appartenant à cette sous-famille ont une fonction importante au cours du développement du fruit chez la tomate.

1.4.1.2.2 Le clade AGL2 comprend lui aussi des membres spécifiques à la tomate

La deuxième superfamille se compose du clade AGL2 et comprend les paralogues AGL6 AGL13, AGL2, AGL4 et AGL9 chez *A. thaliana* (AGL2, AGL4, AGL9 ont été renommés SEPALLATA après la découverte de leur fonction redondante pour maintenir l'identité florale des pétales, étamines et carpelles [25]). La construction d'un arbre phylogénétique a permis de séparer cette famille en trois grands clades; un premier clade comprenant AGL6, AGL13, un deuxième clade comprenant des membres de la famille SEPALLATA avec AGL2 et AGL9 et enfin un troisième clade avec un seul paralogue chez *A. thaliana* (AGL5) contre trois chez la tomate, *rin*, p62 et p59 (**Figure 2**). Les orthologues d'AGL2, AGL6 et AGL9 chez la tomate ont été identifiés, et correspondent respectivement à p40, p51 et p58. En conséquence p59 et p62 sont deux paralogues qui n'existent pas chez *A. thaliana* et sont spécifiques de la tomate et des Solanacées.

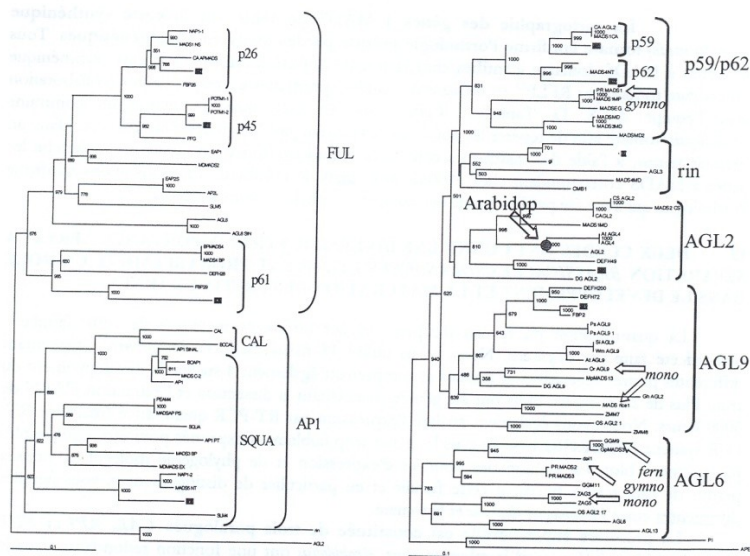


Figure 2 : Phylogénie du groupe II des gènes à domaine MADS. A gauche, clade AP1/FUL, à droite clade AGL6/AGL2/GL9

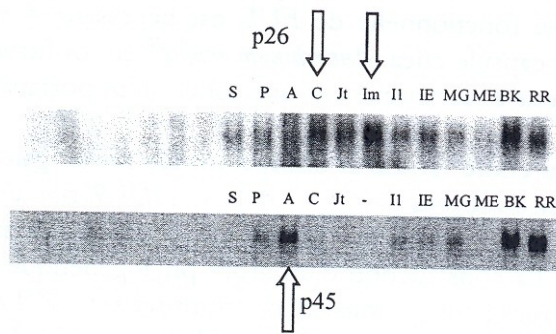


Figure 3 : Expression par Northern Blot de p26 et p45. S=sépale, P=pétale, A=Anthère, C=Ovaire, Jt=Joint (pétiole/fruit), Im=Fruit Immature, I1=Immature 1, IE=Immature 2, MG=Mature Green, ME=Mature Green stade 2, BK=Breaker (tournant, couleur orangé), RR=Red ripe attention français et anglais !

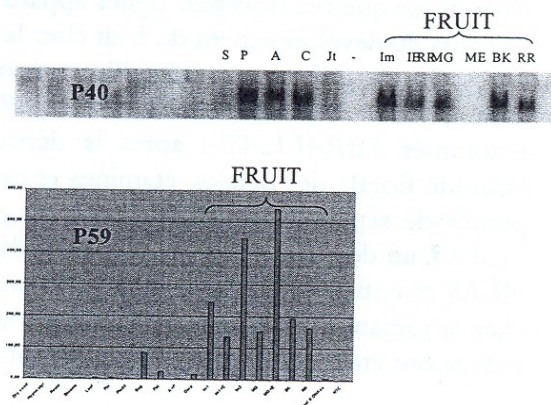


Figure 4 : Expression par Northern Blot de p40 et p59 (p59 par QPCR)

1.4.1.2.3 Ces paralogues tomate-spécifiques sont exprimés au cours de la maturation des fruits

Mes résultats démontrent que les gènes p59 et p62 forment avec *rin* - gène maître de la maturation du fruit chez la tomate – une famille qui s’est étendue et diversifiée chez les solanacées par comparaison avec *A. thaliana* et les Brassicacées (**Figure 2**). J’ai également montré que les paralogues isolés chez la tomate appartenant aux sous-familles FUL et *rin* sont clairement exprimés au cours du développement du fruit (**Figure 3 et 4**). Leurs profils d’expression présentent des différences qualitatives au niveau des organes floraux mais tous voient leur expression augmentée au cours des dernières étapes du développement du fruit (**Figure 3 et 4**), renforçant l’idée qu’ils jouent un rôle important à un stade avancé de son développement.

1.4.1.3 Les analyses de macrosynthénie confirment les résultats phylogénétiques.

Tous les gènes à domaine MADS identifiés chez la tomate ont été localisés sur la carte synthénique *A. thaliana*/*S. lycopersicum* par RFLP en utilisant les sondes spécifiques correspondantes (collaboration avec l’équipe de S. D. Tanksley). Cette carte est constituée de marqueurs communs (**COS** pour **C**onserved **O**rthologous **M**arkers) afin de repérer les zones micro-synthéniques entre les deux espèces [26]. Dans un premier temps, à l’aide des marqueurs COS, nous avons recherché les gènes à domaine MADS correspondant chez *A. thaliana* et dans de nombreux cas nous avons confirmé l’orthologie qui avait été prédite à partir des données de phylogénie moléculaire.

1.4.1.4 Epilogue et conclusion

Le gène p59 a été caractérisé récemment comme étant un gène maître de la maturation du fruit chez la tomate et nommé Arlequin/TAGL1 [27-29], confirmant l’intérêt de l’approche que j’ai développée au cours de mon post-doc. Bien que TAGL1 soit un paralogue des gènes SHATERPROOF d’*A. thaliana*, son expression dans un fond *shp1 shp2* ne permet pas de compléter le double mutant d’*A. thaliana*, confirmant que p59 (et probablement p62) sont 2 paralogues qui ont divergés et qui assurent des fonctions spécialisées chez la tomate [29]. Ce travail a permis de démontrer que la génomique comparative est une approche fructueuse, à la fois pour identifier des orthologues par rapport à une espèce modèle, mais également pour formuler des hypothèses sur la fonction de membres spécifiques. Ces deux familles ont probablement participé à la diversification de la morphologie des fruits au cours de l’évolution récente des plantes à fleurs. Ce travail de post-doc, qui portait sur la phylogénomique, discipline qui venait d’apparaître à l’époque de mon séjour aux USA [30, 31], m’a beaucoup influencé et conduit au développement d’outils de phylogénomique lors de mon recrutement au CIRAD.

1.4.2 Caractérisation fonctionnelle des P-Atpases HMA chez *A. thaliana* 2001-2002

Les métaux tels que le zinc, le fer et le cuivre sont des micro-nutriments essentiels pour le développement des plantes. Leur fort pouvoir réducteur en fait des cofacteurs de choix pour de nombreuses réactions enzymatiques. Mais celui-ci les rendent également très réactif au stress oxydatifs et ils peuvent rapidement devenir toxiques [32 , 33]. De plus, la plante est confrontée à des métaux lourds non-essentiels tels que le cadmium ou le mercure présentant une toxicité élevée. Les plantes ont donc acquis au cours de l'évolution des mécanismes complexes d'homéostasie qui permettent de contrôler les flux de métaux, leur accumulation et leur détoxification. Parmi les protéines spécifiquement impliquées dans le transport des métaux lourds, une nouvelle famille avait été découverte, à l'époque, les transporteurs de type P-ATPase qui prennent en charge le cuivre, le fer et le zinc [34 , 35] La famille des P-ATPases regroupe les enzymes à fonction de transport d'ions ATP-dépendant [35, 36]. Elles présentent comme caractéristiques communes, la formation d'un intermédiaire phosphorylé (d'où le nom d'ATPase de type P), l'inhibition de leur activité par le vanadate et des motifs de séquence très conservés. Elles sont impliquées dans différents processus cellulaires fondamentaux, tels que le maintien du gradient électrochimique (H^+ ATPase chez les plantes), la signalisation cellulaire (Ca^{2+} ATPase), le transport de microéléments essentiels (Zn^{2+} et Cu^{2+} ATPases par exemple) ou leur efflux en cas d'accumulation trop importante [36]. Le séquençage complet du génome d'*A. thaliana* a fait apparaître l'existence de 45 gènes codant des P-ATPases, ce qui en fait l'organisme le plus riche pour ce type de gènes [36]. Parmi ceux-ci, sept gènes constituent le groupe lb codant des protéines supposées impliquées dans le transport de métaux lourds. Leurs séquences présentent un motif de trois acides aminés, CPX qui serait impliqué dans la fixation de métaux. Chez d'autres organismes, les enzymes de cette sous-famille présentent des spécificités de transport vis-à-vis de deux groupes de cations divalents: soit Cu^{2+}/Ag^{2+} soit $Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb$.

Suite à mon embauche comme chercheur au CIRAD en juin 2002, je n'ai effectué que 7 mois de contrat. J'ai donc contribué à initier des travaux sur l'analyse fonctionnelle de 2 gènes HMA2/HMA3. En particulier, j'ai réalisé plusieurs constructions pour compléter des levures déficientes pour plusieurs transporteurs de métaux lourds et initier l'analyse fonctionnelle chez *A. thaliana* de HMA2/HMA3 en développant des constructions RNAi. Ce travail m'a permis de me familiariser non seulement avec l'espèce modèle *A. thaliana* mais aussi avec les outils d'analyse fonctionnelle.

2 Travaux depuis mon embauche au CIRAD 2002-2011

2.1 Le défi posé par le séquençage du génome du riz

Lors de ma prise de fonction en 2002, le riz passait du statut d'espèce d'intérêt agronomique à celui de plante modèle des céréales et des monocotylédones. Le génome du riz était en cours de séquençage, seul celui d'*A. thaliana* avait entièrement été séquencé en 2000 et peu de génomes d'eucaryotes étaient disponibles. Les outils d'analyse fonctionnelle étaient en cours de création. Mon laboratoire d'accueil, dirigé par E. Guiderdoni était impliqué dans un projet Génoplante de création d'une collection de lignées d'insertion de riz et dans le séquençage des séquences flanquantes à ces insertions. L'objectif était de créer un ensemble d'outils de bioinformatiques performant, équivalent à ceux qui existaient alors chez *A. thaliana*.

2.2 Faire du riz l'espèce modèle des monocotylédones 2002-2008

Le problème principal et le plus urgent était de développer de nouveaux outils pour optimiser l'utilisation de l'ensemble des données qui arrivaient en masse et qu'il allait falloir exploiter le plus efficacement et le plus simplement possible. Il fallait créer un outil bioinformatique pour faciliter la génétique inverse sur le modèle de T-DNA express (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Cet outil devait être modulaire et évolutif afin de permettre d'intégrer non seulement les données qui arrivaient mais aussi les données futures, comme les données de transcriptomes, les SNP, les séquences d'autres cultivars etc... Une partie de mes activités a donc été de contribuer à la création, le développement et l'évolution d'une base de données de génétique inverse nommé OryGenesDB (ODB) avec l'appui de l'unité de Bioinformatique du CIRAD alors en cours de constitution et de JB Morel de l'INRA.

Un deuxième souci important était de permettre le transfert des annotations et des résultats d'analyse fonctionnelle entre les deux espèces modèles – riz et *A. thaliana* – afin de faire profiter le riz des avancées d'*A. thaliana* mais également des espèces modèles vers les espèces d'application agronomique comme le maïs, le sorgho, le blé et la canne à sucre. Sur le plan théorique, il s'agit d'un joli concept mais qu'il fallait mettre en pratique. Même à l'époque, avant l'avènement des NGS (Next Generation Sequencing) la quantité de données moléculaires (EST...) grossissait de manière exponentielle et nécessitait le développement d'outils bioinformatiques pour ce transfert d'annotations. Ce constat est à l'origine du projet GreenPhylDB et d'autres outils qui ont été développés au cours de cette période.

2.2.1 Génétique inverse chez le riz: OryGenesDB (ODB)

ODB est une base de données pour la génétique inverse du riz. Elle compile principalement des données de séquences flanquantes d'insertion, T-DNA, Tos17 ou d'autres mutagènes et comporte un navigateur de génome générique ainsi que des couches d'annotations superposées au génome du riz [37]. ODB comprend aussi une suite d'outils qui permettent d'interroger cette base pour rechercher de différentes manières des insertions dans son/ses gènes favoris. ODB a évolué rapidement plusieurs fois en intégrant des données d'annotations de plusieurs laboratoires, par exemple, la position de QTLs/metaQTLs et des données transcriptomiques dans le cadre du travail de JB Morel de l'INRA [38]. ODB a profité des améliorations du logiciel de navigateur de Génome GBrowse, un logiciel OpenSource qui évolue grâce à une communauté active de développeurs [39]. Enfin, la dernière évolution d'ODB a consisté à développer un système interactif et automatisé personnel pour extraire de manière périodique des informations de la base de données en créant un moteur de recherche et des interfaces personnalisées [40]. Plusieurs personnes ont participé à ce projet, incluant Gaetan Droc, un bioinformaticien, JB Morel chercheur à BGPI et plusieurs stagiaires de M2.

2.2.2 Transfert d'annotations entre espèces : GreenPhylDB (GDB)

GreenPhylDB est née de la volonté de transférer les annotations entre les espèces modèles, riz et *A. thaliana*. Ce transfert passe par la recherche d'orthologues, gènes issus d'un événement de spéciation appartenant à la même famille et qui ont la probabilité la plus élevée d'avoir une fonction similaire. Dans un premier temps, nous avons développé une méthodologie pour regrouper l'ensemble des proteomes d'*A. thaliana* et du riz en famille de protéines homologues. Plusieurs milliers de familles ont par la suite été expertisées afin de créer des familles de séquences homologues regroupant des séquences présentant une parenté phylétique, condition *sine qua non* à toute analyse phylogénétique ultérieure. Un système d'analyse phylogénétique automatique a été développé puis optimisé afin d'identifier les orthologues riz/*A. thaliana* pour chacune des séquences protéiques de l'ensemble des familles. Tous ces résultats ont été validés par comparaison à des jeux de données expertisés et en comparant nos prédictions avec celles des meilleurs logiciels disponibles au moment de ce projet [41]. Enfin, nous avons créé une base de données, GreenPhylDB, contenant l'ensemble de ces résultats ainsi qu'un ensemble d'outils pour extraire les relations d'orthologie et de paralogie ainsi que la classification en famille des génomes d'*A. thaliana* [42].

Nous avons également développé un outil, nommé i-GOST pour (interactive GreenPhylDB Orthologous Search Tool). Cet outil permet, en utilisant une séquence protéique provenant d'un autre génome, de prédire les orthologues riz et *A. thaliana* avec un score de confiance [42]. iGOST permet donc d'assurer un transfert d'annotation des espèces modèles vers les espèces d'application et réciproquement. La version 1 de GDB qui ne contenait que les génomes de riz et d'*A. thaliana* à rapidement évolué vers une version 2 qui contient 12 génomes de plantes [43] et la version 3 est en cours de production. Ce projet auquel ont contribué principalement M. Conte un étudiant en thèse que j'ai encadré et M. Rouard, un chercheur de Bioversity, a maintenant acquis un statut d'autonomie important et est en développement continu à travers le projet ARCAD.

2.3 Architecture racinaire et développement

J'ai initié, en parallèle de mes activités de bioinformatique, un travail de recherche sur le développement racinaire du riz. En effet, le développement racinaire était une clef future du développement de nouvelles variétés de riz moins gourmandes en eau et plus tolérantes à différents aléas environnementaux. Par ailleurs, cette piste était peu explorée, le titre d'un livre de référence «Plant roots, the hidden half » en est révélateur [44]. Enfin, des résultats importants étaient déjà disponibles au CIRAD à travers le travail de Brigitte Courtois qui avait déjà démontré qu'il était possible d'améliorer la tolérance à la sécheresse grâce au pyramidage de QTLs de profondeur racinaire. Enfin, le développement racinaire est un modèle passionnant pour comprendre par quels mécanismes les plantes croissent et explorent leur environnement.

2.3.1 Tissus internes racinaires et conditions de vie semi-aquatique chez le riz

Classiquement, on regroupe les tissus des plantes en 3 complexes tissulaires : le système dermal comprenant l'épiderme, le système vasculaire comprenant entre autres les vaisseaux conducteurs et baignant ces deux complexes, le système interne [45]. Les tissus internes sont fait de parenchyme, un tissu peu différencié capable de se diviser et de se différencier en de très nombreux tissus aux fonctions très variés (tissus de types 'épithélia ', de soutien, de stockage, photosynthétiques...). L'apparition du parenchyme, et donc des tissus internes, s'est fait très tôt au cours de l'évolution des plantes, avant même la colonisation des terres émergées par les premières plantes terrestres. Ainsi, les algues multicellulaires les plus proches des plantes terrestres possèdent déjà un tissu de type parenchymateux [46].

Chez le riz, on retrouve cette organisation en 3 complexes tissulaires concentriques, avec à l'extérieur l'épiderme (dermal) qui porte les poils racinaires, au centre la stèle (vasculaire) délimité par le péricycle, et entre les 2 les tissus internes de l'intérieur vers extérieur : l'endoderme, le cortex, le sclérenchyme et l'exoderme. Ces tissus internes forment des couches spécialisées qui possèdent des caractéristiques anatomiques clés pour l'adaptation et la survie du riz. L'endoderme est apparu chez les trachéophytes et représente une innovation fondamentale pour la conquête du milieu terrestre. L'endoderme, et dans une moindre mesure l'exoderme, représentent des barrières sélectives pour l'entrée de l'eau et des ions dans la plante [47]. De nombreuses modifications adaptatives impliquant des variations anatomiques pilotées par les cellules souches des tissus internes sont apparues au cours de l'évolution des plantes supérieures. Les plantes halophytes par exemple, qui poussent en présence de concentrations très élevées en sel, possèdent souvent des couches d'endoderme additionnelles [48]. Un autre exemple concerne la mise en place de plusieurs couches de cortex et leur différenciation en aérénchymes, des cavités remplies d'air, et représente une adaptation à la vie aquatique ou semi-aquatique pour de nombreuses espèces [49, 50]. Ces adaptations évolutives sont apparues de manières indépendantes et répétées dans différentes familles de plantes et sont pilotées par un réseau de gènes partiellement connu.

Comprendre comment se fait la mise en place et comment se différencient ces tissus internes permettrait de développer de nouvelles adaptations anatomiques et de cultiver du riz dans de nouveaux environnements, par exemple en conditions de stress salins ou dans des environnements riches en métaux lourds ou alcalins. Depuis mon recrutement au CIRAD, j'ai donc orienté mes recherches vers cette voie innovante et prometteuse pour l'amélioration végétale de l'espèce. En centrant mon activité sur l'étude de la mise en place et la différenciation des tissus internes racinaires du riz.

2.3.2 Anatomie et morphologie racinaire du riz : mise en place des tissus internes

Dans un premier temps, nous avons conduit une analyse fine, au niveau cellulaire, morphologique et anatomique, du fonctionnement et de la structure des méristèmes racinaires apicaux (RAM pour Root Apical Meristem) chez le riz [49, 50]. Nous avons mis en évidence le fonctionnement des initiales structurales et les différences anatomiques entre les différents types racinaires. Nous avons également publié des revues et développé un modèle intégrant les tout derniers aspects cellulaires, moléculaires, épigénétiques contrôlant la mise en place des tissus internes chez *A. thaliana*. Ce travail a également permis de développer des hypothèses sur le mode de fonctionnement des initiales de ces tissus entre *A. thaliana* et le riz [51]. Ces synthèses nous servent maintenant de référence pour la suite de nos travaux. Ces revues sont le fruit d'une partie du travail de thèse de trois étudiants qui se sont succédé dans le laboratoire, Julia Rebouillat, Yoan Coudert et Germain Pauluzzi.

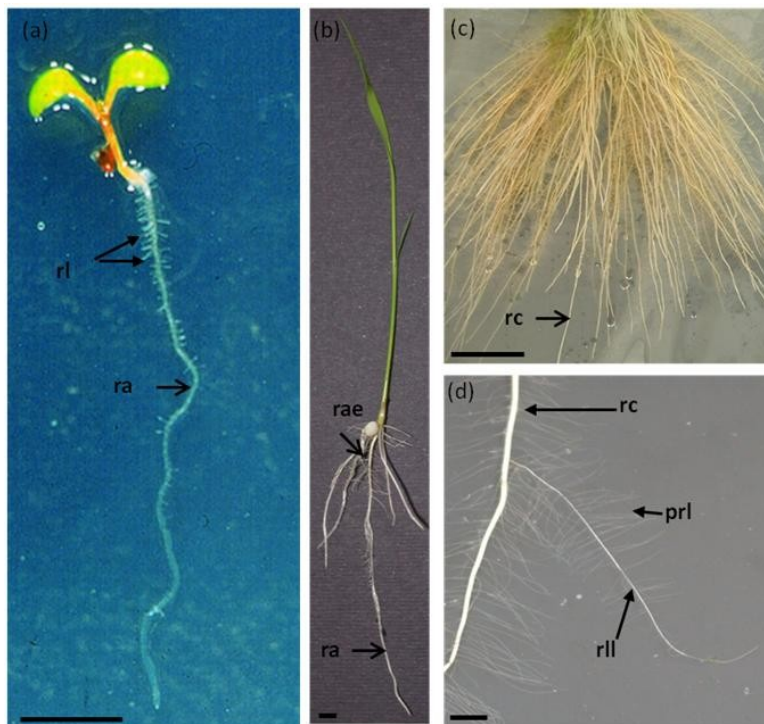


Figure 5: Architecture comparée des systèmes racinaires d'*A. thaliana* et du riz D'après Rebouillat, 2009 (a) Système racinaire d'une plantule d'*A. thaliana* de 5 jours; (b) Système racinaire d'une plantule de riz d'une semaine (cv Nipponbare); (c) Système racinaire d'une plante de 40 jours; (d) Vue détaillée d'une racine adventive; rc, racine coronaire; rae, racine adventive embryonnaire ; rll, racine latérale large; prl, petite racine latérale; ra, radicule. Echelles (a, b, d) 1cm, (c) 5 cm.

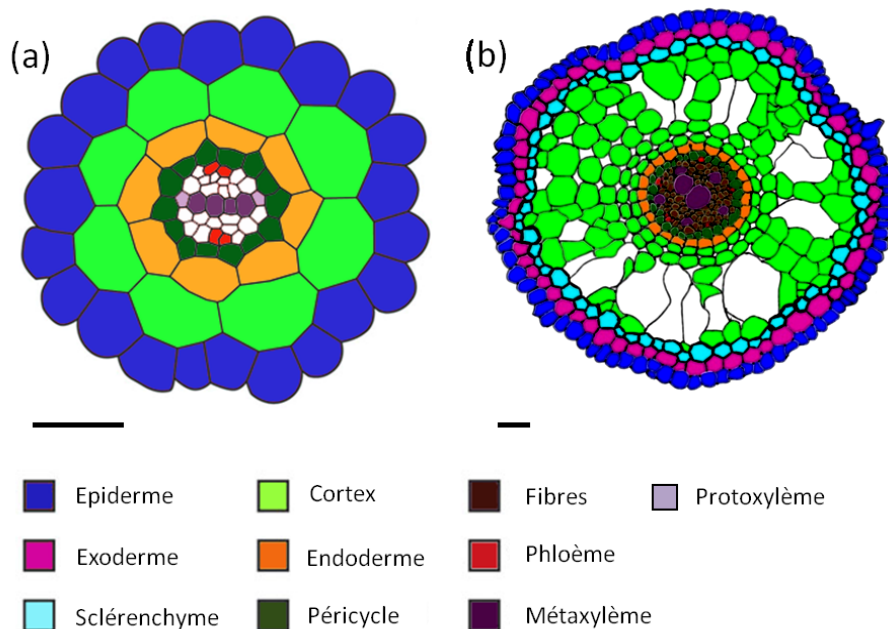


Figure 6: Anatomie radiale racinaire comparée entre *A. thaliana* (a) et le riz (b) d'après Rebouillat, 2009 et Péret, 2010. Représentation schématique de l'organisation radiale d'une radicule. Bar = 25 μ m

Chez *A. thaliana*, le système racinaire se compose principalement d'une seule racine embryonnaire (Figure 5). Il existe cinq types de racines chez le riz [49, 50]. Le premier est la radicule, racine qui se forme à l'opposé du méristème apical de la tige. Le deuxième comprend les cinq premières racines adventives embryonnaires qui émergent du nœud coleoptilaire (**Figure 5**). Les suivantes émergent des nœuds de la tige principale et des ramifications aériennes à travers l'activité de leurs méristèmes apicaux respectifs. Enfin, la radicule et les racines adventives peuvent porter deux types de racines latérales : les petites et grandes racines latérales. Les petites racines latérales sont courtes, à croissance déterminée, agéotropiques et ne portent jamais de racines latérales (**Figure 5**). Les grandes racines latérales, à l'opposé, sont à croissance indéterminées, à géotropisme positif et portent elles-mêmes des racines latérales [49, 50].

De l'extérieur vers l'intérieur, on subdivise l'organisation radiale racinaire en épiderme, tissus internes et stèle (**Figure 6**). Les tissus internes d'*A. thaliana* sont constitués de deux tissus, le cortex et l'endoderme. L'anatomie radiale du riz est complexe et correspond à celle d'une plante adaptée à des conditions de vie semi-aquatiques [49, 50]. Les tissus internes sont eux-mêmes subdivisés en quatre tissus : l'exoderme, qui forme une barrière à l'eau et aux ions similaire à l'endoderme, le sclérenchyme, très lignifié qui joue un rôle structural de maintien de la racine lors de son vieillissement et qui limite les flux d'oxygène vers l'extérieur (une adaptation aux conditions de submersion), le cortex et l'endoderme (Figure 6). Le cortex se différencie en aérénchymes et le nombre de couches de cortex dépend du type racinaire mais également de la position d'émergence de la racine sur la tige principale [49, 50]. Il existe ainsi une très forte corrélation entre le diamètre racinaire et le nombre de couches de cortex [49, 50].

Par ailleurs, nous avons établi un parallèle entre le fonctionnement des initiales entre le riz et *A. thaliana*. Nous avons émis des hypothèses sur leur mode de fonctionnement chez le riz et sur le rôle de plusieurs membres de ce réseau dans les différences qui existent dans la formation des tissus internes entre le riz et *A. thaliana* [51]. Chez *A. thaliana*, la CEI (Cortex Endodermis Initial) se divise anticlinalement, générant une cellule sœur (CEID, Cortex Endodermis Initial Daughter) et régénérant la CIE. La CEID subit alors une division périnclinale asymétrique pour donner l'endoderme et le cortex (**Figure 7**). Chez le riz, il existe lors de l'embryogénèse ou de la formation des racines latérales une cellule initiale dite CEEI (Common Epidermis Endodermis Initial). La CEEI se divise tout d'abord une première fois de manière anticlinale, comme la CEI d'*A. thaliana* puis elle subit une première série de divisions précoces périnclinales et asymétriques qui mettent en place les initiales de l'épiderme, de l'exoderme, du sclérenchyme, du cortex (0-10 couches) et de l'endoderme (**Figure 7**). Tous les types racinaires comportent ces tissus, sauf les petites racines latérales qui n'ont pas de cortex, et le nombre de couches de cortex dépend donc du nombre de divisions de la CEEID.

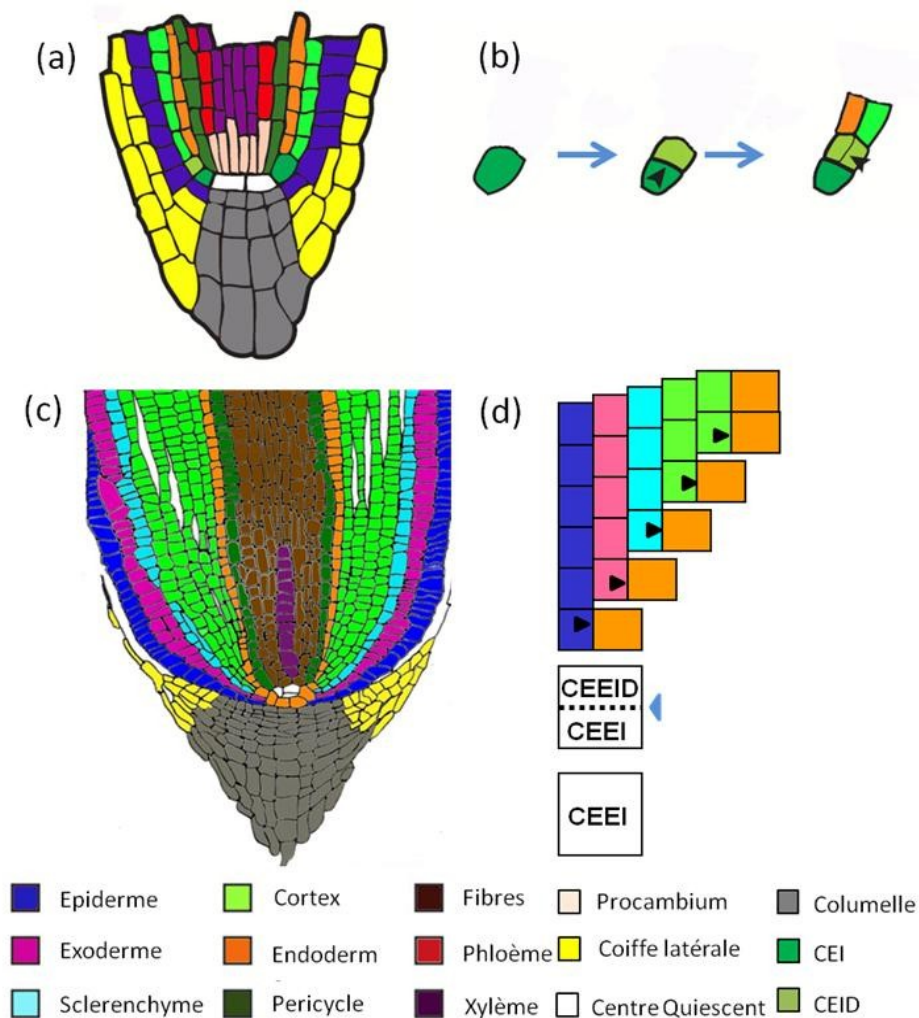


Figure 7: Comparaison de la mise en place des tissus internes entre Riz et *A. thaliana* d'après Rebouillat, 2009 et Nakajima, 2001: (a) Schéma d'une section longitudinale du meristème racinaire fermé d'*A. thaliana*. (b) Séparation des initiales cortex/endoderme, la CEI (cortex endodermis initial) se divise anticlinalement, générant une cellule sœur (CEID, cortex endodermis initial daughter) et régénérant la CIE (première flèche noire). La cellule sœur subit une division périnclinale asymétrique (deuxième flèche noire) pour donner les initiales du cortex et de l'endoderme. (c) Méristème racinaire fermé du riz (d) Les divisions périnclinales répétées d'une initiale epiderme-endoderme commune (CEEI) conduisent à la formation de l'épiderme et de tous les tissus internes chez le riz, une première division anticlinale (flèche bleue) de la CIEE régénère la CIEE. Une série de divisions périnclinales (flèches noires) va conduire à la formation de l'ensemble des initiales des tissus internes, exoderme, sclérenchyme, cortex et endoderme.

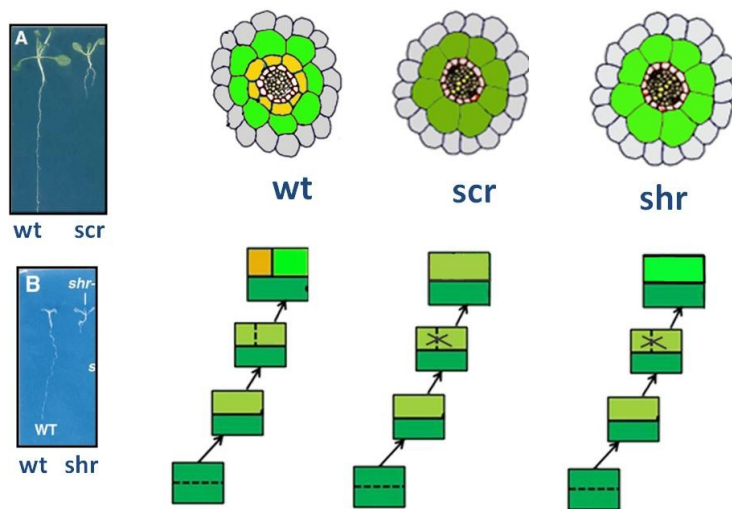


Figure 8: Mutants *scr* et *shr* chez *A. thaliana* (d'après Pauluzzi et al 2012)

Figure (A) et (B), architecture racinaire des mutants SCR et SHR. Figure (C), à gauche mise en place des tissus internes chez le wt. Au milieu une seule couche d'identité mixte, cortex/endoderme est mise en place chez *scr*. A droite, chez *shr*, une seule couche d'identité corticale est formée.

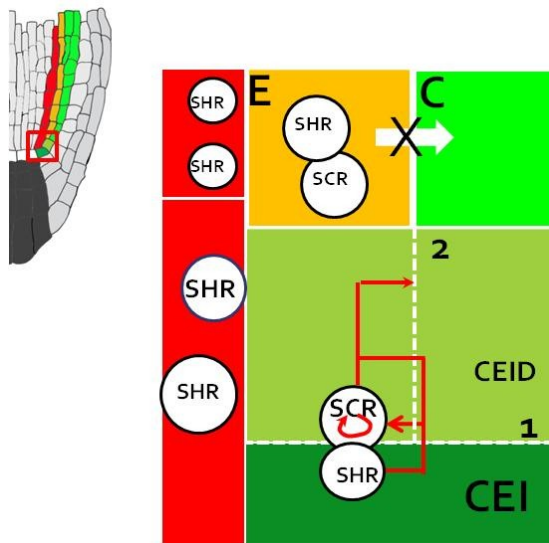


Figure 9 : Modèle de formation du cortex et de l'endoderme (d'après Pauluzzi et al 2012)

A gauche, vue partielle d'un méristème racinaire d'*A. thaliana* avec les tissus internes et le péricycle colorés : péricycle (rouge), endoderme (orange), cortex (vert clair), CEID (vert pale), CEI (vert foncé). SHR est transcrit dans la stèle (péricycle) puis la protéine migre dans la CEID où elle active SCR. SCR active également sa propre transcription et induit la formation d'une division asymétrique péricleinale (2) conduisant à la séparation cortex/endoderme. Dans l'endoderme, SHR spécifie alors l'endoderme et SCR par interaction protéine/protéine séquestre SHR dans le noyau l'empêchant de migrer au delà de l'endoderme. **CEI=initiale commune endoderme/cortex ; CEID=initiale soeur commune endoderme/cortex**

2.3.3 SCR et SHR contrôlent la mise en place des tissus internes chez *A. thaliana*

Deux mutants, *scr* et *shr* présentant des racines courtes à croissance déterminée ont été isolés il y a presque deux décennies chez *A. thaliana* [52, 53]. Ils ne présentent qu'une seule couche de tissu interne au lieu du cortex et de l'endoderme normalement présents dans le type sauvage (**Figure 8**). A l'aide de marqueurs moléculaires, il a été démontré que l'identité de la couche de tissu interne (GT pour « Ground Tissue ») présente chez *scr* était mixte présentant des caractéristiques de l'endoderme et du cortex alors que cette couche était d'identité corticale chez *shr*. Le gène *SCR* contrôle donc la mise en place de la division formative de la CEI séparant cortex et endoderme alors que *SHR* contrôle à la fois la mise en place de cette division et la spécification de l'endoderme [52, 53] (**Figure 8**).

Les modes d'action de *SCR* et de *SHR* ont été précisés dans une série de papiers. Nous avons également publiés une revue récente qui fait la synthèse des résultats accumulés au cours des 10 dernières années [51]. Brièvement, le gène *SCR* est transcrit dans l'endoderme alors que *SHR* est exprimé dans la stèle. La protéine *SHR* est mobile et migre de la stèle dans l'endoderme et la CEI où elle active la transcription de *SCR*. Après induction, *SCR* est également capable d'auto-activer sa transcription. *SCR* induit alors la division asymétrique de la CEI et permet la séparation de couches de GT. Dans la couche interne de GT ainsi formée, *SHR* spécifie l'endoderme. *SCR* est capable, à travers des interactions protéine/protéine de séquestrer *SHR* dans le noyau empêchant ainsi *SHR* de migrer dans la couche de GT externe formée (**Figure 9**). Ce processus permettait d'aboutir à la formation des couches d'endoderme et de cortex de l'intérieur vers l'extérieur.

D'autres facteurs de transcriptions et plusieurs hormones ont également un rôle important dans la mise en place des tissus internes. Ces travaux ont de plus confirmé le rôle central de *SCR* et de *SHR* dans la mise en place des tissus internes [51]. Naturellement, il s'est immédiatement posé la question de la fonction des orthologues à *SHR* et *SCR* dans la formation des tissus internes de riz. Il existe 2 orthologues chez le riz. Les résultats disponibles au début de ce projet étaient limités : *OsSHR1* est transcrit dans la stèle, alors qu'*OsSCR1* serait exprimé spécifiquement dans l'endoderme comme leurs orthologues respectifs chez *A. thaliana* [54, 55]. *OsSHR2* présentait un profil d'expression beaucoup plus large qu'*OsSHR1* et aucune information n'était disponible pour *OsSCR2* [54]. Par ailleurs, *OsSHR1* et *OsSCR1* interagissent ensemble en double hybride dans la levure (Y2H) suggérant qu'il existe une conservation de fonction pour *OsSHR1/OsSCR1* chez le riz [55]. Une étude fonctionnelle de 4 membres de la famille GRAS: *OsSHR1*, *OsSHR2*, *OsSCR1*, *OsSCR2* a donc été initiée. Ce travail a fait l'objet de la thèse de Germain Pauluzzi.

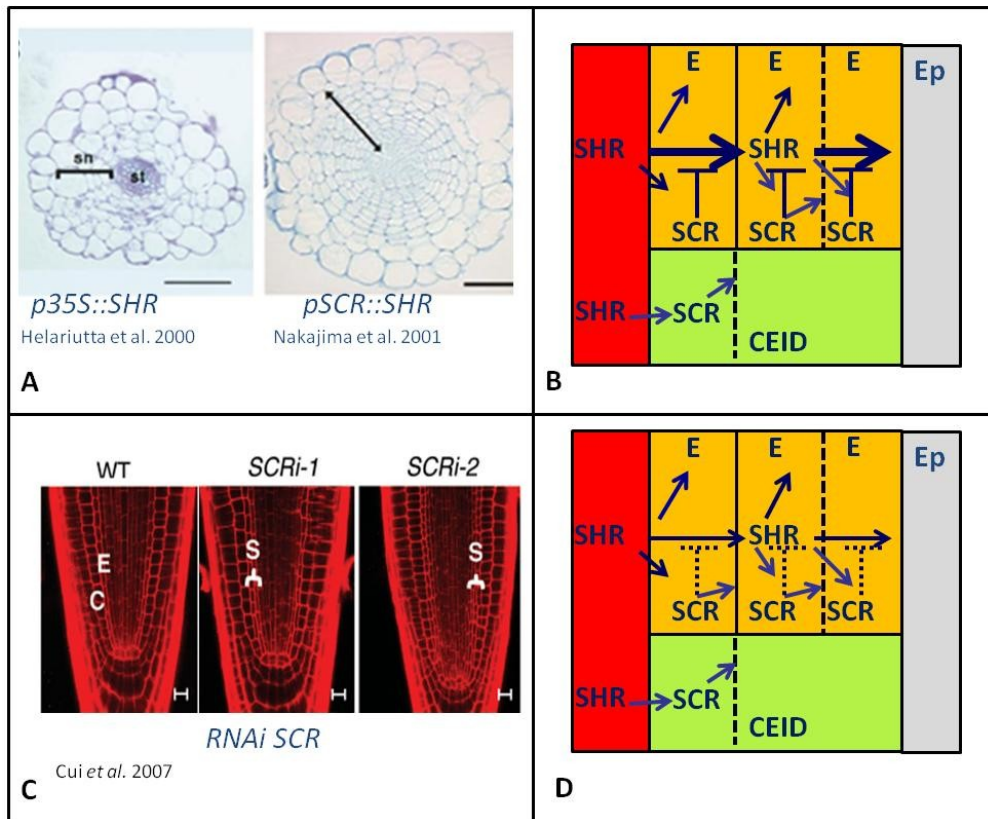


Figure 10 : la surexpression de SHR (A) et (B) ou la diminution du niveau de SCR (C) et (D) induit la formation de couches surnuméraires de tissus internes chez *A. thaliana*.

(A) La surexpression de SHR à l'aide d'un promoteur constitutif (à gauche *p35S::SHR*) ou endoderme spécifique (à droite *pSCR::SHR*) induit la formation de couches de tissus surnuméraires (sn). **(B)** Modèle simplifié de **(A)** où la surexpression de SHR permet à la protéine de déborder le système de séquestration nucléaire de SCR (flèche inhibitrice) et de migrer au delà de la couche interne induisant la formation de couches d'endoderme supplémentaires. **(C)** La diminution du niveau de SCR à l'aide de deux lignées RNAi (*SCRi-1* et *SCRi-2*) a pour conséquence d'augmenter le nombre de couches de tissus internes. **(D)** Modèle simplifié de **(C)** où la diminution du niveau de SCR (flèche inhibitrice en pointillés) permet à SHR de migrer au delà de la couche interne induisant la formation de couches d'endoderme supplémentaires.

2.3.4 Rôle OsSHR1 et d'OsSHR2 dans la mise en place des couches de cortex

2.3.4.1 La surexpression de AtSHR augmente le nombre de couches de GT chez *A. thaliana*

Le mutant perte de fonction *scr* possède une seule couche de tissu interne (cf **Figure 8**) mais un des rôles de SCR est de séquestrer SHR dans l'endoderme (**Figure 9**). La diminution du niveau de transcrit de *SCR* induit la formation de couches supplémentaires de tissu internes d'identité endodermale (**Figure 10**). En effet, le niveau de SCR ne permet plus une séquestration complète et efficace de SHR dans l'endoderme et la protéine est capable de migrer dans la couche adjacente où elle induit de nouvelles divisions qui génèrent endoderme puis cortex (**Figure 10**) et ainsi de suite. La surexpression de SHR, en utilisant un promoteur endoderme spécifique (pSCR) ou constitutif (p35S) induit la formation de racines larges qui possèdent un nombre très important de couches de tissus internes d'identité endodermale (**Figure 10**) [56, 57]. Le modèle suggère que le niveau de protéine SHR 'déborde' le mécanisme de séquestration de SCR ce qui conduit à de nouvelles divisions formatives de l'endoderme et *in fine* à la formation d'un grand nombre de couches d'endoderme (**Figure 10**). Ensemble, ces résultats amènent à l'hypothèse que la formation des tissus internes chez une espèce possédant plusieurs couches de tissus internes comme le riz pourrait être contrôlée par une variation du ratio d'expression entre *SHR* et *SCR*.

2.3.4.1.1 La surexpression de *OsSHR1/2* augmente le nombre de couches de GT chez le riz

Les surexpresseurs *OsSHR1* ou *OsSHR2* possèdent des racines très larges (**Figure 11**) qui excèdent pour certaines très largement le diamètre des lignées contrôles régénérées en même temps. Des analyses de PCR quantitative ont permis de confirmer que toutes les plantes transgéniques avec des racines larges et courtes surexprimaient les gènes *OsSHR1* et *OsSHR2* avec des niveaux pouvant atteindre parfois 500 fois pour les lignées surexpresseurs utilisant un promoteur constitutif pUBI et de l'ordre de 10-20 fois pour les lignées surexpresseurs utilisant un promoteur stèle spécifique.

Un très grand nombre de couches surnuméraires de tissus internes sont observées entre l'épiderme (portant des poils racinaires) et la stèle (**Figure 12**). Les analyses histologiques à l'aide de marqueurs spécifiques de l'endoderme, exoderme et du sclérenchyme ont permis de montrer que les lignées surexpresseurs possédaient toutes une couche de sclérenchyme, d'exoderme plus ou moins régulière et une seule couche d'endoderme suggérant que les couches surnuméraires étaient d'identités corticales (**Figure 12**).

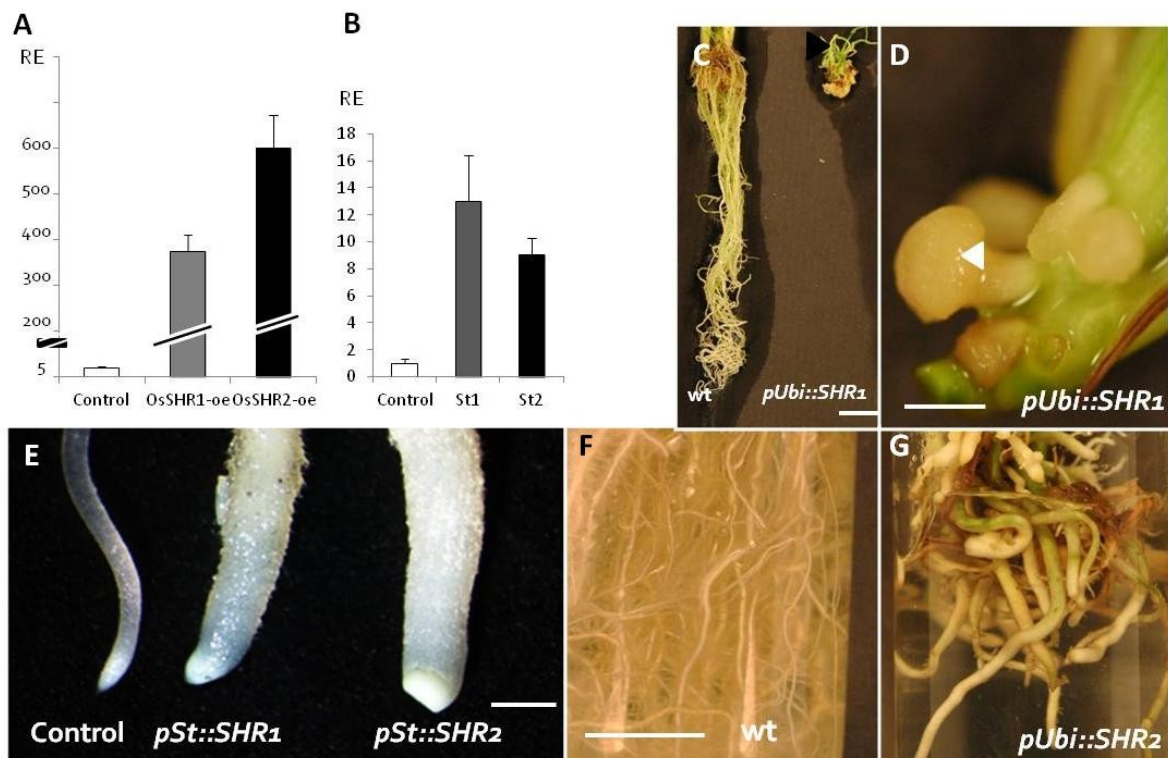


Figure 11 : Surexprimeur de OsSHR1 et OsSHR2

(A) Niveau d'expression relative (RE) par QPCR des surexprimeurs pUbi::OsSHR1 (OsSHR1-oe) et pUbi::OsSHR2 (OsSHR2-oe). (B) Niveau d'expression relative (RE) par QPCR des surexprimeurs stèle spécifiques pSt::OsSHR1 (pSt1) et pSt::OsSHR2 (pSt2). (C) et (D) Phénotype d'un surexprimeur de SHR1 sous contrôle d'un promoteur pUbi. (E) Pointes racinaires d'un contrôle et de deux lignées surexprimeurs pSt::OsSHR1 et pSt::OsSHR2. (F) et (G) vue partielle d'un tube in vitro contenant une plante contrôle et une lignée surexprimeur pUbi::SHR2.

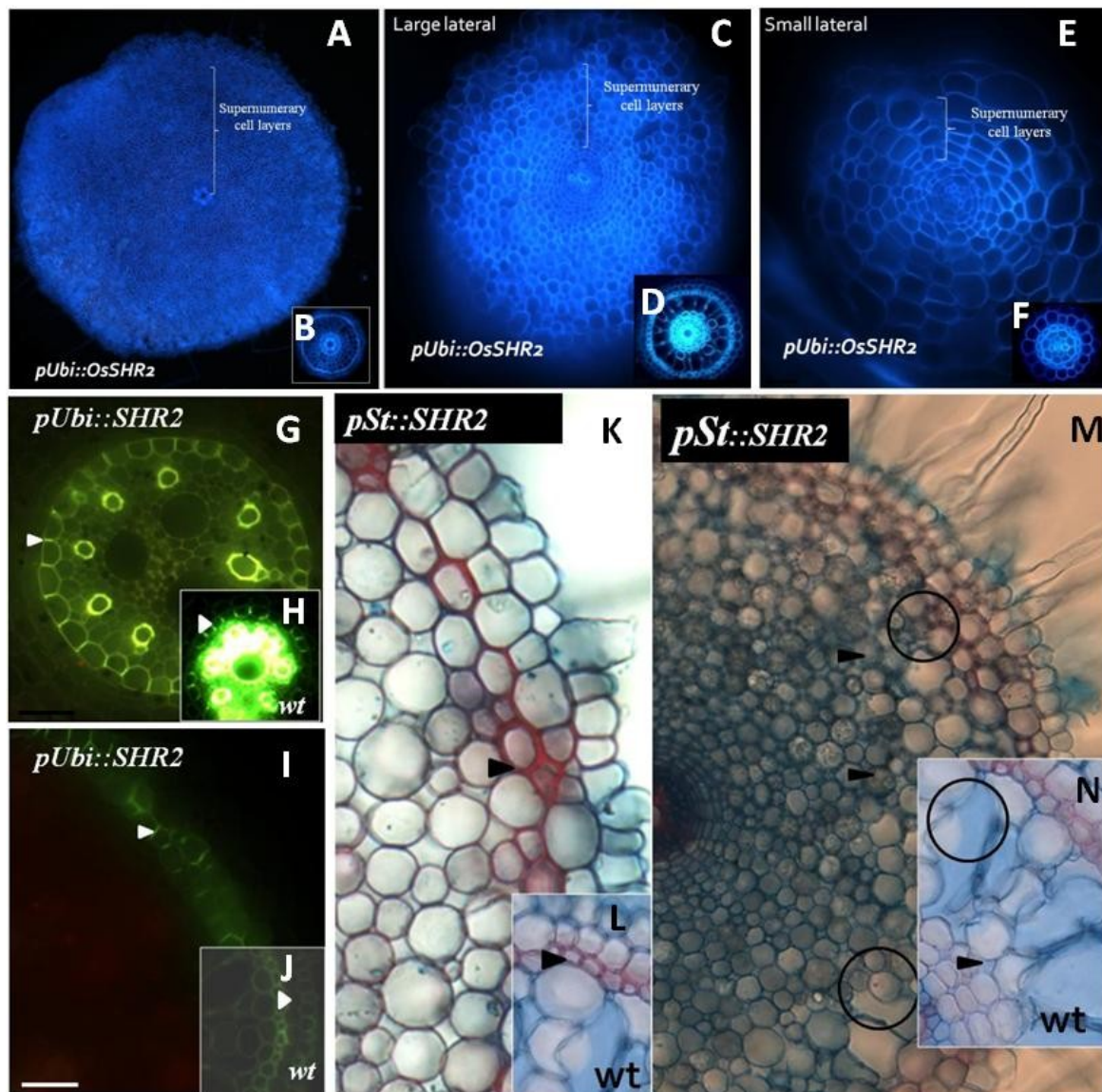


Figure 12 : Anatomie radiale et identité des couches cellulaires des racines des surexprimeurs OsSHR1 et OsSHR2.

(A) Anatomie radiale d'une lignée pUbi::SHR2 possédant plus de 40 couches supplémentaires de tissus internes. (B) A la même échelle, coupe radiale d'un contrôle. (C) Anatomie radiale d'une grande latérale d'une lignée pUbi::SHR2 et à la même échelle du contrôle (D). (E) Anatomie radiale d'une petite latérale d'une lignée pUbi::SHR2 et à la même échelle du contrôle (F). Une seule couche d'endoderme (G) et d'exoderme (I) (flèche) est visible après coloration à la berbérine dans une coupe radiale d'une lignée pUbi::SHR2. Cette coloration similaire à celle observée chez le contrôle (H) et (J). (K) Une seule couche de sclérenchyme (flèche) est visible après coloration dans une coupe radiale d'une lignée pSt::SHR2 similaire à celle observée chez un contrôle (L) bien que plus irrégulière. (M) Les couches supplémentaires de tissu internes développent des espaces intercellulaires (flèches) et il existe également des aérénchymes (cercles) aussi bien dans une lignée pSt::SHR2 que dans une lignée contrôle (N).

Dans les lignées contrôles, le cortex se différencie en aérénchymes, des cavités remplies d'air qui assure la respiration des racines à partir des parties aériennes non submergées, par deux processus successifs, la schizogénie et la lysogénie. Le processus de schizogénie, le premier à se mettre en place conduit au décollement partiel des cellules de cortex les unes des autres et à l'apparition d'espaces intercellulaires chez la lignée contrôle. Lors du processus de lysogénie, une mort cellulaire programmée est mise en place, les cellules meurent et fusionnent conduisant à l'apparition d'aérénchymes. Dans toutes les lignées surexprimeurs on observe l'existence d'espaces intercellulaires confirmant que ces couches ont une identité corticale (**Figure 12**). En revanche, on n'observe l'apparition d'aérénchymes que chez les lignées surexprimeurs sous contrôle d'un promoteur stèle spécifique suggérant que la surexpression d'*OsSHR1* et *OsSHR2* inhibe la mort cellulaire. Si on compare nos résultats avec ceux obtenus par surexpression d'*AtSHR* chez *A. thaliana* on obtient dans les deux cas des couches supplémentaires de tissu internes mais d'identité endodermale chez *A. thaliana* et corticales chez le riz. Par rapport au modèle développé pour *A.thaliana* cela suggère tout d'abord que les mécanismes de formation de l'endoderme et du cortex diffèrent entre les 2 espèces. Il est frappant de constater que cette surexpression permet d'augmenter le nombre de couches de cortex chez le riz. Or ce nombre est variable entre les types racinaires et en fonction du site d'émergence des racines adventives d'origine post-embryonnaires.

2.3.4.1.2 *OSHR1* est probablement le seul paralogue impliqué dans la formation du cortex

Le diamètre, et donc le nombre de couches de cortex des racines de riz est en fait établi très précocement, lors de la formation des primordia [58]. Par exemple, le type de racine latérale qui émerge dépend du nombre de divisions de la CEEID et ce nombre de divisions est mis en place bien avant l'émergence des racines latérales. Dans l'hypothèse que *OsSHR1* et/ou *OsSHR2* contrôlent le nombre de divisions péricleinales de la CEEID on s'attend à un profil d'expression très précoce lors de la formation des primordia de racines latérales et des racines adventives. Or, en se basant sur les résultats des lignées transgéniques p*OsSHR1*::GUS et p*OsSHR2*::GUS (**Figure 13**), *OsSHR1* est exprimé lors de la formation des primordia de racines latérales et au niveau de la stèle, donc dans le péricycle qui est la zone de formation des racines latérales (**Figure 13**). *OsSHR2* est exprimé tardivement bien après l'émergence des racines latérales et son expression se limite à la pointe racinaire. *OsSHR2* est exprimé partout et son profil se réduit aux tissus différenciés qui bordent les cellules du cortex qui subissent de la mort cellulaire programmée (**Figure 13**). *OsSHR2* jouerait donc un rôle différent peut-être en inhibant l'extension de la mort cellulaire programmée. Alternativement, il ne peut être exclu qu'il joue un rôle dans la mise en place des divisions tardive de la CEEID impliquées dans la mise en place du cortex « moyen » chez le riz.

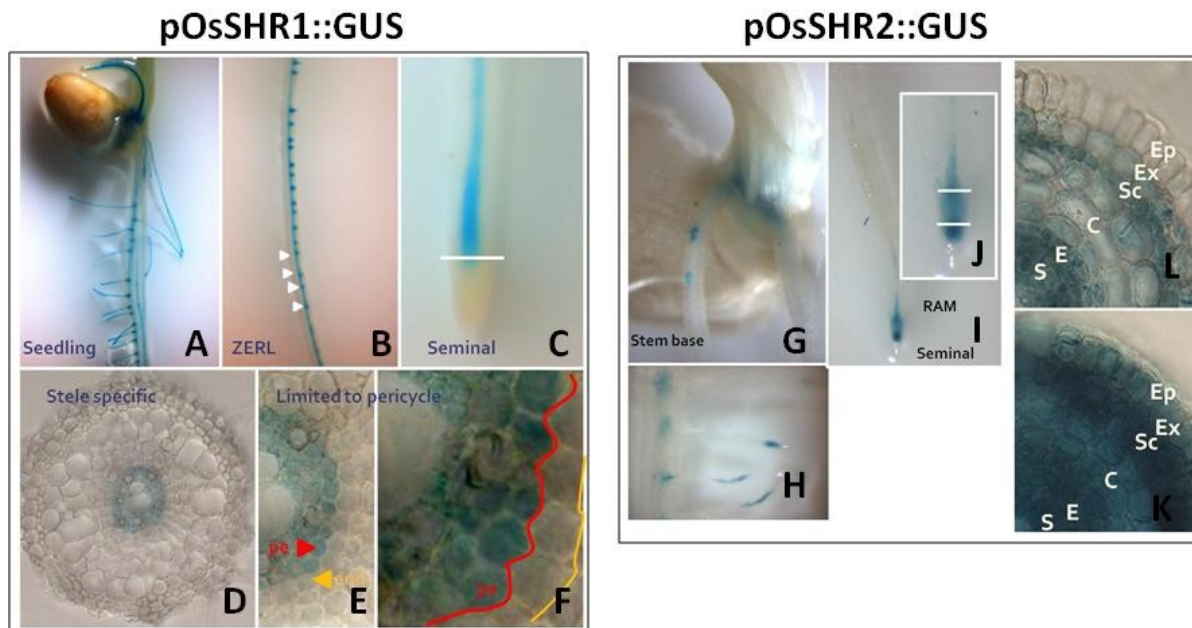


Figure 14 : coloration GUS lignées pOsSHR1::GUS (A-F) et pOsSHR2::GUS (G-L)

(A) plantule de 7 jours avec une coloration intense interne visible également au niveau des primordia (B) de racines latérales (flèches). La coloration s'étend au niveau des RAM (C). Les sections au niveau de (C) permettent de montrer que *OsSHR1* est exprimé au niveau de la stèle (D) et plus précisément s'étend jusqu'au péricycle (E) et (F) mais absent de l'endoderme. Pe=péricycle, en=endoderme. (G) plantule de 7 jours avec une coloration essentiellement localisée au niveau des zones de jonction racines latérales/racines primaires mais qui est également visible au niveau des RAM des latérales et des principales plusieurs jours après émergence (H). La coloration est surtout présente au niveau des RAM (I) et des coupes sériées ont été réalisées dans le méristème (J). (L) *OsSHR2* est exprimé partout au niveau du RAM proche du centre quiescent puis se réduit et se localise principalement dans le sclérenchyme, la stèle, l'endoderme et la première couche de cortex (K)

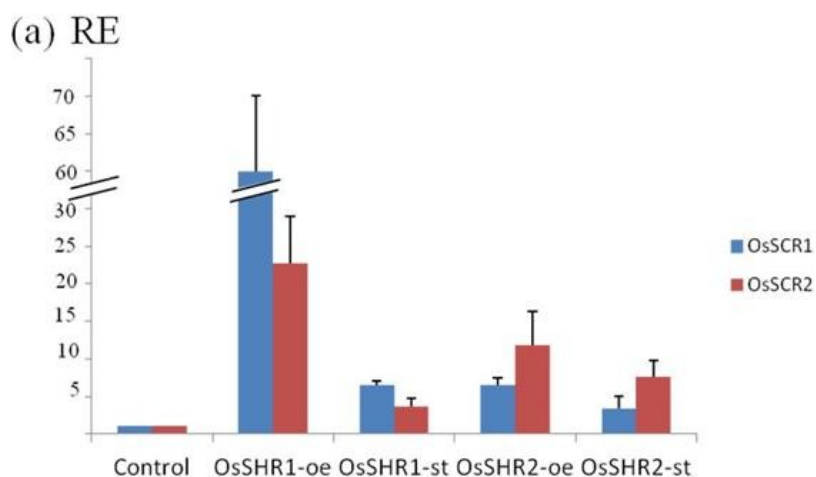


Figure 15 : Niveau relatif (RE) d'expression de *OsSCR1* (bleu) et *OsSCR2* (rouge) dans les lignées surexprimeurs de *OsSHR1* et *OsSHR2* avec les promoteurs constitutifs (-oe) ou stèle spécifiques (st)

2.3.4.1.3 La surexpression de OsSHR1 et OsSHR2 induit la surexpression de OsSCR1 et OsSCR2

Chez *A. thaliana*, *AtSHR* contrôle l'expression d'*AtSCR* au niveau du RAM. Par PCR quantitative nous avons mis en évidence une surexpression d'*OsSCR1* et d'*OsSCR2* dans les lignées surexprimeurs d'*OsSHR1* et *OsSHR2* (**Figure 15**). *OsSHR1* active préférentiellement l'expression d'*OsSCR1* et dans une moindre mesure *OsSCR2* alors que le résultat est inversé dans les lignées surexprimeurs d'*OsSHR2* (**Figure 14**). Grâce à des amorces n'amplifiant que les gènes endogènes *OsSHR1* et *OsSHR2* nous avons également vérifié que ni *OsSHR1* ni *OsSHR2* ne régulait leur propre transcription ni la transcription de leurs paralogues *OsSHR2* et *OsSHR1*.

Nos résultats suggèrent que le mécanisme de mise en place d'un nombre variable de couches de cortex dépend de l'augmentation du niveau d'expression d'*OsSHR1* qui induit à son tour la surexpression d'*OsSCR1* et *OsSCR2*. Ceci participe à la mise en place d'un nombre plus ou moins important de divisions de l'initiale CEEID. Par ailleurs, *OsSHR1* et *OsSHR2* inhibent la mort cellulaire dans les couches de cortex racinaires. Indirectement, nos résultats démontrent également que la surexpression des *OsSHRs* affecte seulement la mise en place du cortex mais n'altère pas la formation des autres tissus internes de la racine ni la formation de l'épiderme. Il reste néanmoins possible qu'*OsSHR1* ou *OsSHR2* jouent un rôle essentiel et spécifique dans la formation de ces tissus et seule l'analyse de mutants knock-out permettra de formuler une réponse. En effet, *OsSHR2* est exprimé dans le sclérenchyme et l'exoderme, ce qui pourrait indiquer qu'il joue un rôle dans la différenciation/formation de ces tissus ou bien qu'il y inhibe la mort cellulaire [59].

2.3.4.1.4 OsSCR2 inhibe la formation du cortex tardif dans les racines de riz

Chez *A. thaliana*, nous avons vu qu'une réduction du niveau de *AtSCR* conduisait à l'apparition de couches supplémentaires de cortex, et plus particulièrement de middle-cortex (**Figure 10**). Cette couche supplémentaire de cortex apparaît tardivement chez *A. thaliana*, plus d'une semaine après germination et à distance de la CEI. *AtSCR* semble donc avoir un effet inhibiteur des divisions formatives du cortex. Chez le riz, il existe également des divisions tardives de l'endoderme qui forment une couche de cortex. En particulier, elle apparaît à distance du RAM, les premières divisions se font au niveau des cellules adjacentes à un pôle de protoxylème et progressent en hélice exactement comme chez *A. thaliana*.

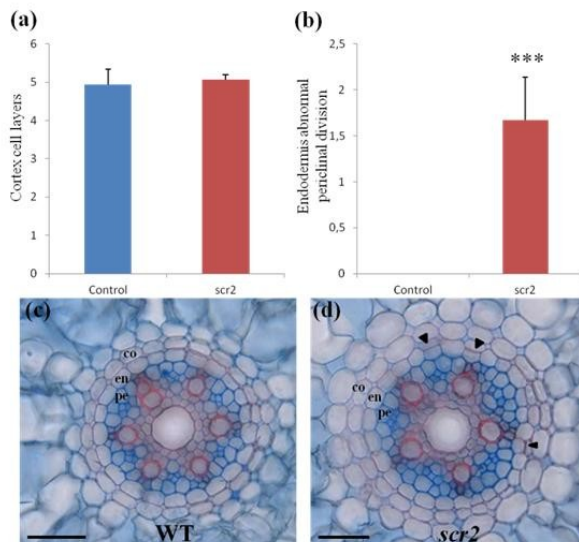


Figure 16: Anatomie radiale des racines séminales de *scr2*

Coloration au FASGA d'une section radiale d'une racine séminale d'une lignée contrôle (a) et chez le mutant *scr2* (b) Aucune différence dans le nombre de couches de cortex est observé mais des divisions ectopiques sporadiques de l'endoderme sont observés dans le fond *scr2* (d) et absentes des lignées contrôles (c) (flèches noires). Pe=pericycle, en=endoderme, co=cortex, flèches noires= divisions ectopiques sporadiques de l'endoderme. Bar = 25 μ m (***= $p < 0.001$)

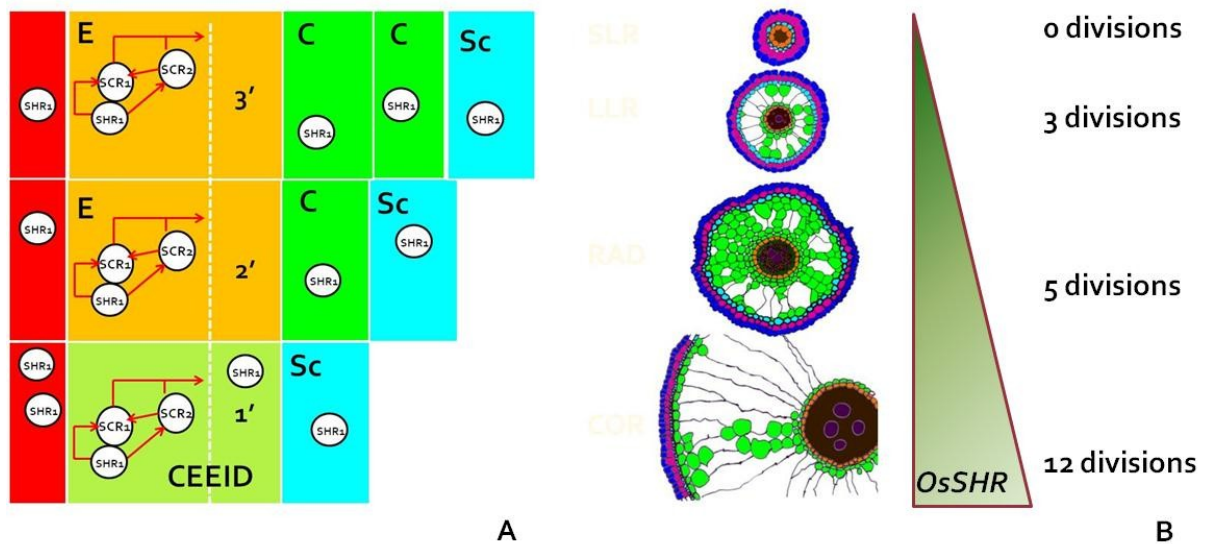


Figure 17 : Modèle hypothétique de formation du cortex dans les racines de riz.

(A) Modèle moléculaire simplifié. (B) Le diamètre racinaire serait déterminé par le niveau de transcrit de *OsSHR1* dans la stèle, minimal dans les petites latérales (en haut) et maximal dans les racines adventives les plus larges (en bas), intermédiaires dans les autres cas.

Sc=Sclerenchyma, C=cortex, E=Endoderme, CEEID=Initiale commune epidermis/endodermis. 1', 2', 3' première, deuxième et troisième division péricleinale formative de la CEEID

Un mutant T-DNA KO pour *OsSCR2* a été isolé au laboratoire. Le mutant présente un phénotype aérien de réduction du nombre de ramifications aériennes et une diminution de la longueur racinaire et aérienne. Au niveau racinaire, *scr2* produit des divisions ectopiques péricleinales de l'endoderme (**Figure 16**) absente des lignées contrôles, réminiscentes de celles observées dans les lignées RNAi *AtSCR* chez *A. thaliana*. *OsSCR2* est fortement induit par un stress salin et en conséquence, lorsque l'on applique un stress salin à *scr2* le nombre de divisions ectopiques observées en conditions contrôles est multiplié par 3. Par ailleurs, dans le fond *scr2*, l'expression du gène *OsSCR1* est divisée par 5. L'ensemble de ces résultats suggère que comme chez *A. thaliana*, *OsSCR2* inhibe l'apparition du cortex moyen dans les racines.

2.3.4.1.5 Les protéines OsSHR1 et OsSHR2 migrent dans l'ensemble du RAM chez le riz

Chez *A. thaliana*, *AtSHR* est exprimé dans la stèle, où son expression est à la fois nucléaire et cytoplasmique. La protéine est capable de migrer dans la couche adjacente au péricycle ou elle est exclusivement localisée dans le noyau. *AtSCR*, exprimé dans l'endoderme, est capable de séquestrer *AtSHR* dans le noyau et de bloquer toute mobilité supplémentaire d'*AtSHR*. Nous avons réalisé des fusions traductionnelles pOsSHR::OsSHR:mCherry2x pour *OsSHR1* et *OsSHR2*. La fluorescence est retrouvée pour les deux constructions dans l'ensemble des couches dans le RAM. Or, *OsSHR1* est transcrit dans la stèle et ce résultat suggère qu'*OsSHR1* est mobile et est capable de migrer dans l'endoderme mais également dans toutes les couches du RAM, un résultat clairement différent de celui observé dans *A. thaliana*.

2.3.4.1.6 *OsSCR1* ne semble pas capable de séquestrer *OsSHR1* et *OsSHR2* dans l'endoderme

La surexpression d'*OsSCR1*, sous contrôle d'un promoteur ubiquitine constitutif n'induit aucun phénotype visible chez le riz. Or chez *A. thaliana*, la surexpression de *AtSCR* est responsable de l'apparition d'un phénotype *shr-like*. Dans les surexprimeurs d'*A. thaliana*, *AtSHR* n'est plus mobile et son expression devient nucléaire dans la stèle et absente de l'endoderme, confirmant que l'un des rôles clefs de *AtSCR* est de séquestrer *AtSHR*. Dans les surexprimeurs d'*OsSCR1* nous n'observons aucune modification de la structure radiale des racines de riz (résultats non montrés) et aucun phénotype n'est observé. Ces deux résultats, surexprimeurs d'*OsSCR1* et localisation des protéines *OsSHR1* et *OsSHR2* convergent et suggèrent que chez le riz, il n'y a pas de séquestration de *OsSHR1* (et *OsSHR2*) par *OsSCR1*.

Chez *A. thaliana*, il a été démontré que ce mécanisme de séquestration passait par une interaction protéine-protéine entre *AtSCR* et *AtSHR*. Les protéines *OsSHR1*, *OsSHR2* interagissent en double hybride avec *AtSCR*, *AtMGP*, *AtJKD* (collaboration K. Gallagher U. Penn.) suggérant que la non séquestration de *OsSHR1* par *OsSCR1* n'est pas due à l'absence d'interaction protéique mais à un autre mécanisme.

2.3.4.1.7 Les protéines OsSHR1 et OsSHR2 assurent-elles des fonctions spécifiques ?

Il semble clair qu'*OsSHR1* et *OsSHR2* ont des profils différents et probablement des fonctions divergentes. *OsSHR2* a un profil d'expression inhabituel, comparé à *OsSHR1* et *AtSHR*. Il reste possible qu'*OsSHR1* joue un rôle équivalent à *AtSHR* chez le riz. *OsSHR2* serait alors lié à un événement de néofonctionnalisation et jouerait un rôle dans l'inhibition de la mort cellulaire dans les tissus adjacents au cortex. *OsSHR1* jouerait lui le rôle majeur dans la mise en place des primordia racinaires et dans les variations de diamètre racinaire à travers le nombre de divisions périclinales de la CEEID.

2.3.4.1.8 Un modèle hypothétique de mise en place du cortex chez le riz

Sur la base des résultats obtenus et moyennant quelques hypothèses, nous avons déduits un modèle de formation du cortex chez le riz. *OsSHR1* est transcrit dans la stèle et migre dans l'ensemble des couches de RAM, incluant la CEEID. De là, *OsSHR1* induit *OsSCR1* et *OsSCR2* ce qui induit une succession de division périclinales, le nombre de divisions périclinales étant déterminés quantitativement par la quantité de transcrit de *OsSHR1* présent dans la stèle (**Figure 17**). Ces divisions périclinales forment les couches de cortex successives. *OsSHR2*, transcrit plus tard permettrait de limiter la mise en place de la mort cellulaire programmé au seul cortex et empêcherait son extension à l'exoderme et à la première couche de cortex.

3 Projet : Les cellules souches racinaires des tissus internes et le développement adaptatif racinaire chez le riz

3.1 Cellules souches, identité cellulaire et divisions formatives

L'identité cellulaire et la formation des tissus et organes sont des questions fondamentales aussi bien dans le règne végétal que dans le règne animal. Les cellules souches sont à l'origine de la formation et de l'identité de l'ensemble des tissus chez les végétaux et sont localisées au niveau des méristèmes, les zones de croissance et de formation des parties aériennes et souterraines. Les méristèmes racinaires se subdivisent en plusieurs zones comprenant un centre organisateur entouré par les cellules souches. Ces cellules souches sont capables d'assurer la formation de tous les tissus et sont mises en place lors de l'embryogénèse ou lors de la néoformation de nouvelles racines pour former l'ensemble des tissus de la racine [60, 61]. Les cellules souches se répartissent en 3 à 4 groupes pour former l'épiderme, les tissus internes de la racine, la coiffe racinaire et la stèle contenant les vaisseaux conducteurs.

Les cellules souches des tissus internes chez le riz, comme chez la plupart des monocotylédones assurent la mise en place de tissus spécialisés dans le captage et la sélectivité des minéraux et nutriments du sol comme l'endoderme, le cortex, le sclérenchyme et l'exoderme [49, 50]. L'objectif du travail de recherche est d'identifier les réseaux de gènes contrôlant l'identité et le fonctionnement des cellules souches racinaires des tissus internes de la racine ainsi que les régulations qui interviennent dans cette mise en place. Cette identification permettra à moyen et long terme de développer des variétés possédant des modifications anatomiques à valeur adaptative en recherchant des combinaisons d'allèles favorables. Je propose d'employer deux approches complémentaires. Dans une première approche, je conduirai l'analyse fonctionnelle chez le riz des orthologues de gènes clefs qui interviennent dans la formation des tissus internes chez *A. thaliana*. C'est l'approche que nous avons déjà initié avec Germain Pauluzzi, pour les gènes SCR et SHR et que je me propose d'étendre. Dans une deuxième approche, plus risquée et plus exploratoire, je propose d'identifier des gènes clefs chez le riz grâce à la combinaison d'approches de transcriptomique sur des populations de cellules souches racinaires. Des technologies innovantes doivent être mises en place rapidement et seront la clef du succès de ce projet.

3.2 Evo-devo des gènes impliqués dans la formation des tissus internes

3.2.1 Fonction des couples de co-orthologues *OsSHR1/2* et *OsSCR1/2*

Sur la base des résultats obtenus dans le cadre de la thèse de G. Pauluzzi, Seul *OsSHR1* serait nécessaire à la formation de l'endoderme et à la régulation du nombre de couches de cortex. La surexpression de ces deux gènes induit à la fois une inhibition de la mort cellulaire et l'augmentation de couches de cortex à travers l'augmentation du nombre de divisions périclinales de la CEEID [59]. L'hypothèse de néofonctionnalisation d'*OsSHR1* et d'*OsSHR2* repose principalement sur les profils d'expression distincts de ces deux gènes (**Figure 14**). *OsSHR1* a une expression précoce lors de la mise en place par exemple des primordia des racines latérales et des racines adventives. Or il a été établi que les différences de diamètre entre racines latérales résultent d'une augmentation du nombre de divisions périclinales de la CEEID avant leur émergence. Seul le profil d'expression d'*OsSHR1* est donc compatible avec ce résultat. *OsSHR2* n'est exprimé que tardivement au niveau du RAM mais son profil d'expression est compatible avec une fonction comme inhibiteur de la mort cellulaire. *OsSHR2* est exprimé au niveau du RAM dans l'ensemble des cellules puis dans la zone de différenciation. Son expression disparaît des couches de cortex qui se différencient en aérénchyme. *OsSHR2* est aussi exprimé dans la première couche de cortex jouxtant l'endoderme et qui ne subit pas de mort cellulaire. Son profil d'expression semble donc compatible avec une fonction supposée dans l'inhibition de la mort cellulaire.

Afin de mettre à l'épreuve ces hypothèses, il est nécessaire d'analyser des mutants perte de fonction pour ces deux gènes. L'analyse de lignées mutées pour *OsSHR1*, obtenus par tilling d'une banque de mutants EMS de riz (cv Nipponbare) va donc débuter et, suivant la même approche, des lignées mutées pour *OsSCR1* et *OsSHR2* seront identifiées. Par ailleurs, les lignées pUBI::*OsSHR1*:EAR, pUBI::*OsSHR2*:EAR, pUBI::*OsSCR1*:EAR qui ont été produites et qui sont supposées convertir tous ces facteurs de transcriptions supposés activateurs en répresseurs seront analysées. Des lignées KO seront produites par TALEN (cf plus bas) d'abord à travers une collaboration avec CELLECTIS puis en développant au laboratoire cette technologie. Enfin, ces lignées seront complémentées à l'aide d'un système inductible utilisant *OsSHR1* pour démontrer que le niveau d'expression de cette protéine détermine le diamètre racinaire à travers le nombre de divisions de la CEEID.

3.2.2 Autres membres du réseau SCR/SHR chez le riz

D'après nos résultats, il semble exister une différence de contexte moléculaire et cellulaire entre *A. thaliana* et *O. sativa* dans le fonctionnement respectif des initiales des tissus internes. La variation du niveau d'expression d'*OsSHR1* et d'*OsSHR2* semble en effet contrôler le nombre de couches de cortex chez le riz ? Quel en est l'origine et quels mécanismes sont en cause ? Chez *A. thaliana*, *AtSHR* et *AtSCR* interagissent avec de nombreux facteurs de transcription (FT) et protéines intervenant dans le mouvement de cellule à cellule. Plutôt que de démarrer l'analyse fonctionnelle d'orthologues d'autres membres du réseau qui semblent jouer un rôle plus mineur dans la mise en place des tissus internes chez *A. thaliana*, l'approche qui sera développée est une approche interactome pour *OsSCR1* et *OsSHR1*. Cette approche sera développée avec Hybrigenics pour la partie criblage double hybride et l'équipe de Kim Gallagher (U.Penn) pour comparer les interacteurs de SHR entre *A. thaliana* et le riz.

Cette approche a démarré et les premiers résultats ont été obtenus récemment. Tout d'abord Kim Gallagher et son équipe ont démontrés qu'*OsSHR1* et *OsSHR2* interagissent bien avec *AtSCR*, contrairement aux résultats de Cui et al [55] où seul *OsSHR1* était décrit comme interagissant avec *AtSCR* [55]. De plus, les premiers résultats d'Y2H en utilisant *OsSCR1* comme proie ont été obtenus par Hybrigenics. Un total de 35 protéines interagissant avec *OsSCR1* ont été identifiées et pour la plupart n'ont jamais été décrites. Plusieurs protéines interviennent dans des mécanismes communs et/ou des voies moléculaires identiques incluant des facteurs de transcription, des gènes impliqués dans la mise en place des divisions cellulaires, dans la réponse hormonale et dans la dégradation de protéines.

Tous ces mécanismes moléculaires sont d'ailleurs supposés intervenir dans la mise en place des divisions asymétriques de la CEID chez *A. thaliana* et l'ensemble représente donc des candidats sérieux qui seront analysés par la suite. Leur dépendance transcriptionnelle à *OsSHR1* et *OsSCR1*, par analyse de PCR quantitative des lignées surexprimeurs et le phénotype de leurs KO feront partie des premières analyses qui seront conduites. Des lignées inducibles complémentées pour *OsSHR1* seront également utilisées pour identifier des gènes induits en réponse en *OsSHR1* en privilégiant des cibles primaires de ce FT. Ces résultats seront comparés aux résultats des interactomes d'*OsSHR1* et *OsSCR1*.

3.2.3 Modifications géniques ciblés : la chirurgie génique grâce aux TALEN

L'analyse fonctionnelle est dépendante de l'existence de lignées d'insertion, RNAi, amiRNA ou tilling. Elle est donc aléatoire et même si il existe maintenant des collections de lignées d'insertion cela reste une étape cruciale. Nous sommes actuellement confronté à ce problème pour l'analyse des fonctions respectives de *OsSHR1* et *OsSHR2* puisque les lignées RNAi, amiRNA, antisens ou par cosuppression produites n'ont pas permis d'identifier de lignées perte de fonction.

Par ailleurs, le remplacement d'allèle dans le contexte moléculaire du gène ciblé serait un gros progrès pour étudier la fonction d'un gène, par exemple en introduisant une mutation ponctuelle ou en fusionnant un gène rapporteur par insertion génique ciblée. Malheureusement, la recombinaison homologue n'est disponible que chez quelques organismes. Chez les plantes supérieures, elle n'est actuellement fonctionnelle que chez *Physcomitrella patens*.

Les TALE (Transcription Activator Like Element) ont été découvertes chez le pathogène des plantes, *Xanthomonas*. Les TALEs sont injectés par *Xanthomonas* dans les cellules de plantes et se lient spécifiquement à l'ADN régulant l'expression de gènes cibles durant l'infection par *Xanthomonas* [62]. Chaque TALE contient une région centrale répétitive qui est formée par la répétition d'unités de 35 acides aminés. Chaque répétition reconnaît un nucléotide différent et cette spécificité est assurée par la variation de seulement 2 acides aminés à l'intérieur de chaque répétition [62, 63]. Il est donc possible de construire des TALE artificiels reconnaissant n'importe quelle séquence d'ADN en combinant ces répétitions dans une seule construction. Ce système peut-être utilisé pour induire ou réprimer la transcription de n'importe quel gène [64] mais son principal intérêt est sa combinaison avec une endonucléase qui introduit une cassure double brin de l'ADN [65] (**Figure 18**). On parle alors de TALN [66] ou TALEN (TALE endonuclease) qui est en fait un hétérodimère qui comprend deux TALE fusionnés à une endonucléase. Ces TALEN sont capables d'induire une coupure dans deux séquences très proches. L'ensemble reconnaît une séquence ADN particulière avec une très grande spécificité. Les TALEN ou TALN peuvent être utilisés pour induire une mutation à un site particulier à travers le NHEJ (Non Homologous End Joining) ou pour introduire un transgène par HR (Homologous Recombination). En effet, les cassures double brin stimulent la HR. En utilisant une construction possédant en 5' et en 3' des séquences homologues bordant les sites de coupures d'un TALEN, il est possible d'introduire n'importe quelle séquence par HR. Comparativement aux technologies concurrentes comme les ZFN (Zinc Finger Nucleases), les TALEs sont faciles à construire à faible coût car leurs séquences sont complètement prédictibles et leur cytotoxicité semble beaucoup plus faible, même si il reste plusieurs points à préciser comme leur spécificité de reconnaissance [67].

De nombreuses publications récentes ont par ailleurs démontré leur versatilité et leur universalité aussi bien chez les animaux modèles, cellules en culture et cellules souches. Des technologies pour faciliter la construction à façon des TALEN ont aussi été développées pour construire des TALE ciblant n'importe quelle séquence génomique et ont démontrés leur fonctionnalité [68, 69]. Dans le cadre de ce projet de recherche, il est crucial de parvenir à développer une technologie TALEN fonctionnelle afin de permettre une analyse fonctionnelle simplifiée par remplacement d'allèle. Le laboratoire, à travers plusieurs projets et collaborations est impliqué dans le processus de développement de TALEN fonctionnels chez le riz et OsSHR1 et OsSCR1 seront les premiers gènes ciblés.

La stratégie utilisée consistera à développer deux vecteurs qui permettront d'induire la recombinaison homologue et le remplacement d'allèle tout en contre-sélectionnant tout événement de recombinaison illégitime. Brièvement, un premier vecteur permettra de cloner deux TALEN fusionnés à la nucléase FokI permettant à la fois la reconnaissance de la zone ADN d'intérêt et l'induction d'une cassure double brin. La transcription de ces TALEN sera sous le contrôle, soit d'un promoteur inductible par la chaleur (HSP7.1) que nous avons déjà testé au laboratoire afin d'éviter toute toxicité qui serait due à une expression prolongée des TALEN, soit à l'aide d'un promoteur constitutif type pUBI. Dans un deuxième vecteur, les deux segments d'homologie gauche et droite de la zone d'intérêt et d'environ 1000 pb seront clonés et l'élément à insérer ou à remplacer sera également cloné entre ces 2 zones d'homologie. Dans un premier temps, afin de tester le système, le gène hygromycine permettant la sélection des événements de recombinaison sera testé. Des calli de riz seront alors co-transformés par *Agrobacterium* avec ces deux constructions. Un choc thermique de 37°C pendant 24 heures sera appliqué ce qui activera les TALEN, induira une cassure double brin au niveau de la zone d'intérêt et permettra l'insertion du gène hygromycine. Les événements de recombinaison homologues seront sélectionnés grâce à la résistance à l'hygromycine et tous les événements de recombinaison illégitime seront contre-sélectionnés en raison de la présence d'un gène tueur, le gène DTA, sous contrôle d'un promoteur 35S dans la construction en orientation sens et inverse proche des bordures gauche et droite. Chaque fois que le T-DNA s'insérera par un événement de recombinaison illégitime, le gène DTA sera activé et tuera la cellule transformée. Ce système a déjà été utilisé pour augmenter le taux de recombinaison homologue chez le riz avec succès dans le passé [70].

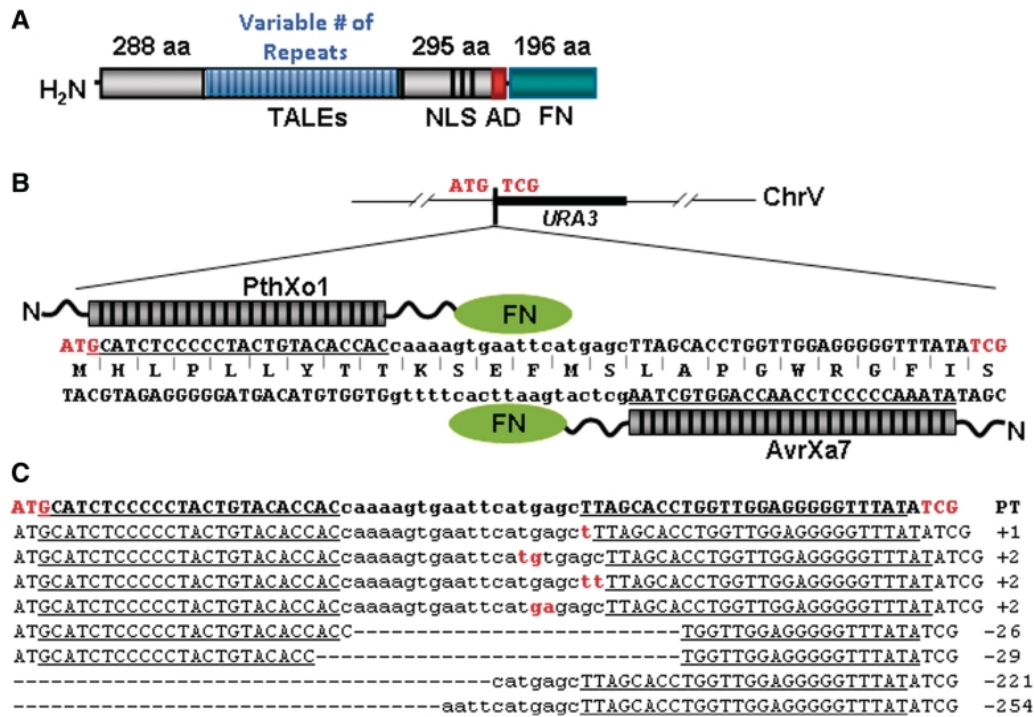


Figure 18:Altérations de l'ADN générées par un TALENs dans le gène de levure *URA3* gene. (A) Vue Schématique du TALENs. Les TALEs pleine longueur ont été fusionnés avec le domaine de clivage homodimérique de FokI (FN). Le nombre d'acides aminés des différentes parties est visible au dessus de chaque région (NLS, nuclear localization motifs; AD, transcription activation domain). (B) Séquences ciblées entre le premier et le second codon du gène *URA3* par le TALEN hybride dérivé de AvrXa7 et PthXo1. (C) Alignement des séquences génomiques des mutants et des souches parentales au site de fixation du TALEN. Le nombre de nucléotides insérés (lettres minuscules en rouge) ou manquantes (tirets) comparativement aux séquences parentales (PT) de chaque colonie mutante est indiqué sur la droite de chaque séquence d'après [71].

3.3 Signaux de différenciation et cellules souches des tissus internes

3.3.1 Signaux de différenciation des tissus internes de la racine

L'étude de la mise en place des tissus dans la racine est facilitée par la structure des divisions méristématiques racinaires. Ces divisions stéréotypées génèrent chez la plupart des végétaux des files cellulaires bien séparées [49-51, 61]. Une analyse superficielle suggère qu'une cellule mère, une initiale, donne naissance à une descendance clonale de cellules filles de même spécificité. L'identité cellulaire serait alors précocement déterminée au cours du développement et la position des divisions serait un déterminant clef du "cell fate". Contrairement aux apparences, des résultats récents et plus anciens ont réfutés cette hypothèse. Par exemple, des mutants affectés dans la position des divisions cellulaires, par exemple les mutants tonneau ou fass [72, 73] ou katanin [74] possèdent des divisions randomisés et différencient pourtant des organes normaux possédant les mêmes tissus que des plantes contrôles. Par ailleurs, si les divisions responsables de la formation d'un embryon chez *A. thaliana* obéissent à un ordre et des divisions très stéréotypées, la formation d'embryons chez de nombreuses monocotylédones comme le maïs et le riz [58] ne suit pas ce schéma mais aboutit néanmoins à la formation d'un embryon parfaitement structuré en organes et viable.

C'est la position d'une cellule dans un environnement (niche) et donc l'existence de signaux de différenciation échangés entre cellules qui est la clef qui permet aux cellules de se différencier et de diviser correctement. L'ablation de toutes les CEID en contact avec une seule CEI dans le méristème racinaire d'*A. thaliana* inhibe toute division asymétrique ultérieure des CEID qui vont être produites par la suite par la CEI ainsi isolé. Seules des divisions anticlinales vont être visibles mais plus aucune division asymétrique [75]. Les CEID tendent donc à promouvoir la différenciation de la CEI en CEID et la formation des deux couches de tissus internes. L'ablation d'une cellule du QC induit elle une division asymétrique periclinale de la CEI, à la place d'une division anticlinale, et l'initiale se comporte alors comme une CEID confirmant qu'un des rôles du QC est d'inhiber la différenciation des initiales [76]. Il existe donc deux signaux antagonistes qui maintiennent les initiales dans un statut indifférencié.

Un premier signal provenant des cellules différenciées tend à promouvoir la différenciation des initiales alors qu'un signal provenant du QC tend lui à maintenir les initiales à l'état indifférencié. C'est donc une balance entre ces deux signaux antagonistes qui forme le mécanisme dynamique positionnel qui permet la formation des tissus chez *A. thaliana* [76]. Enfin, l'ablation de toutes les cellules du QC conduit à la formation d'un nouveau QC à partir des cellules adjacentes de la stèle et l'ablation de la CEI induit la formation d'une nouvelle CEI par division péricleinale d'une cellule de péricycle adjacente sans qu'il semble nécessaire de repasser par un stade de dédifférenciation [76].

Il existe en fait deux types de signaux échangés : les signaux long distance, principalement hormonaux comme l'auxine et les signalisations locales impliquant peptides, facteurs de transcription, miRNA et d'autres hormones. L'auxine principalement synthétisée au niveau du méristème apical de la tige (Shoot Apical Meristem or SAM) est activement transportée dans la racine par transport polarisé d'auxine (Polarized Auxin Transport or PAT) grâce à des transporteurs d'efflux (gènes PIN) et d'influx (gènes LAX). L'auxine, grâce à une boucle de recirculation dans le RAM est responsable de la formation d'un gradient au niveau du RAM, gradient qui permet la mise en place d'une niche de cellules souches à travers la les FT PLETHORA (PLT) et joue un rôle critique dans la structuration et la croissance des RAM [77-79]. Ce signal long distance agit en amont des signalisations locales. L'auxine est également responsable des événements de priming qui permettent de spécifier les futures cellules fondatrices des racines latérales [80]. Enfin, l'auxine est également le relais primaire de nombreux tropismes racinaires comme la réponse à la gravité du méristème racinaire qui passe par une redistribution asymétrique de l'auxine responsable *in fine* d'une croissance différentielle de la racine [81]. Au niveau local, d'autres signaux existent qui permettent la différenciation des tissus racinaires. Ainsi, le gène SHR est transcrit dans la stèle et la protéine est capable de migrer dans la couche adjacente qui formera l'endoderme. Ce signal permet d'activer SCR et d'induire une division formative qui sépare deux couches de tissus internes. SHR va alors spécifier l'endoderme et induire la transcription d'un miRNA, miR166/165 qui va par la suite migrer dans la stèle et par dégradation de plusieurs de ces cibles, principalement des FT de la famille des HD-Zip-III, conduire à la différenciation des vaisseaux du xylème et du métaxylème [51].

L'objectif de ce projet donc d'identifier ces signaux, apicaux/basaux ou transversaux chez le riz ou les GT forment un modèle original pour appréhender ces mécanismes. Le projet repose en particulier sur l'utilisation de lignées promoteurs spécifiques de certaines couches cellulaires afin de caractériser l'identité de mutants, manipuler l'expression de gènes dans certaines zones tissulaires/cellulaires, identifier des différences transcriptionnelles, et enfin parvenir à identifier ces signaux de différenciation.

3.3.2 Promoteurs et lignées enhancer trap spécifiques des tissus internes de la racine

Nous disposons au laboratoire d'une collection de lignées ADN-T [82] dont une partie, comprenant plus de 6 000 lignées indépendantes, a été créée en utilisant une construction enhancer trap utilisant la GFP-ER (Green Fluorescence Protein adressée au reticulum endoplasmique) et le système GAL4-UAS-GFP [83]. Cette construction, lorsqu'elle s'insère près d'une séquence régulatrice, exprime la GFP sous contrôle de cette séquence régulatrice. Il s'agit donc d'une collection de lignées exprimant la GFP dans des tissus/organes très variés. Un premier travail de caractérisation partielle de cette collection a permis de montrer qu'il existait des lignées possédant des profils d'expression spécifiques de certains tissus racinaires [83].

Nous avons donc entrepris une caractérisation complète de cette collection et avons criblé environ 90 000 plantes pour isoler des lignées possédant une expression dans les pointes racinaires. Ce travail a été achevé cet été et nous avons isolé 425 lignées candidates. L'analyse détaillée de ces 425 lignées pour rechercher des lignées avec des profils d'expression spécifiques des tissus internes racinaires a débuté. Les 90 premières lignées ont permis d'identifier 11 lignées avec une expression spécifique respectivement dans l'épiderme (2), la stèle (3), la coiffe racinaire (2), l'exoderme et le cortex. Le criblage va se poursuivre dans les prochaines semaines. L'expression GFP de l'ensemble de ces lignées dans les pointes racinaires sera analysée à l'aide d'un microscope multiphotonique. Plusieurs fusions transcriptionnelles ont été également construites et plusieurs promoteurs possédant une expression spécifique ont été validés. Le promoteur d'*OsSHR1* possède une expression spécifique de la stèle, pOsSCL3 à une expression spécifique de l'endoderme et de la racine, pOsCSP1 à une expression spécifique de l'endoderme et de l'exoderme.

3.3.3 Technologie INTACT (Isolation of Nuclei Tagged in specific Cell Types)

La technique nommée INTACT consiste, à l'aide d'un promoteur spécifique de la couche cellulaire ciblée, à isoler les noyaux marqués avec une protéine d'enveloppe nucléaire biotinylée [84, 85]. Les plantes sont alors broyées dans l'azote liquide et les noyaux purifiés grâce à des billes magnétiques recouvertes de streptavidine qui se lie très fortement à la biotine (**Figure 20**). Ce système ne nécessite pas de système perfectionné pour isoler les tissus ni de mises au point compliquées, peut être utilisé pour de nombreux tissus en parallèle et a démontré son intérêt [85] par rapport aux deux méthodes alternatives, FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) [86] et LCM (Laser Capture Microdissection) [87, 88] qui nécessitent des appareillages complexes et de nombreuses mises au point. Elle nécessite néanmoins d'avoir des promoteurs/lignées marquées spécifiques des tissus à séparer/isoler. Les lignées marqueurs de couches cellulaires isolées décrites précédemment seront croisées ou retransformées à l'aide de constructions INTACT qui seront développées spécifiquement dans le cadre de ce projet

3.3.3.1 Construction de nouveaux vecteurs INTACT

Afin d'isoler les noyaux des couches des 4 tissus internes racinaires, il faut marquer les noyaux des couches correspondantes avec les protéines d'enveloppe nucléaire biotinylée. Nous exploiterons une particularité de la construction des lignées enhancer trap sélectionnées. En effet, ces lignées permettent de faire de la transactivation. En bref, une lignée qui possède une expression spécifique de l'endoderme par exemple, permet d'exprimer n'importe quel gène dans cette couche en la transformation à l'aide d'une construction contenant la séquence codante précédée d'une séquence régulatrice composée de plusieurs répétitions UAS ou par croisement (**Figure 20**).

Nous allons donc développer un nouveau vecteur INTACT qui permettra d'utiliser les lignées enhancer trap criblées spécifiques de 4 tissus racinaires. La construction comprendra un promoteur constitutif (pUBI) qui exprimera la biotine ligase dans toutes les cellules, et comprendra une protéine NTF (Nuclear Targeting Fusion) qui reprend les différentes parties du système INTACT [85], le domaine WPP de AtRAN1, le peptide BRLP qui agit comme le substrat de biotinylation et nous remplacerons la GFP par la CFP (Cyan Fluorescence Protein). La NTF sera contrôlée soit par un tétramère UAS pour la transactivation avec les lignées enhancer trap, soit par des promoteurs spécifiques grâce à un site de clonage multiple. La cassette sera synthétisée par un sous-traitant (GenScript). La cassette sera réintroduite dans un plasmide pCAMBIA2300 afin de permettre une double sélection antibiotique (**Figure 20** pour la construction). La construction INTACT sera transformée dans le cultivar Nipponbarre et dans les lignées enhancer trap possédant des profils d'expression tissus spécifiques.

3.3.3.2 Profils d'expressions couches spécifique par RNAseq

Les lignées enhancer trap spécifiques des tissus racinaires internes et possédant la construction INTACT introduite par croisement ou transformation seront fixées et multipliées. Environ 100 plantules de chacune de ces plantes transgéniques seront broyées et les noyaux extraits grâce à des billes magnétiques enveloppées de streptavidine. Les ARN seront isolés à l'aide du kit RNAeasy (Qiagen) utilisé de routine au laboratoire. Deux technologies sont disponibles pour quantifier les niveaux d'expression de l'ensemble du génome du riz. Une première technologie utilise les puces à ADN riz développées par affymetrix [89] et a été utilisée au laboratoire [90] et dans de nombreux laboratoires à travers le monde. Alternativement, les technologies de séquençage massif apparues dans les 5 dernières années offrent une alternative intéressante et permettent surtout de détecter en plus des gènes exprimés, des séquences non codantes, les miRNA, et facilitent les analyses d'expression différentielles (technique RNAseq) [91]. Nous utiliserons donc une approche de séquençage massif.

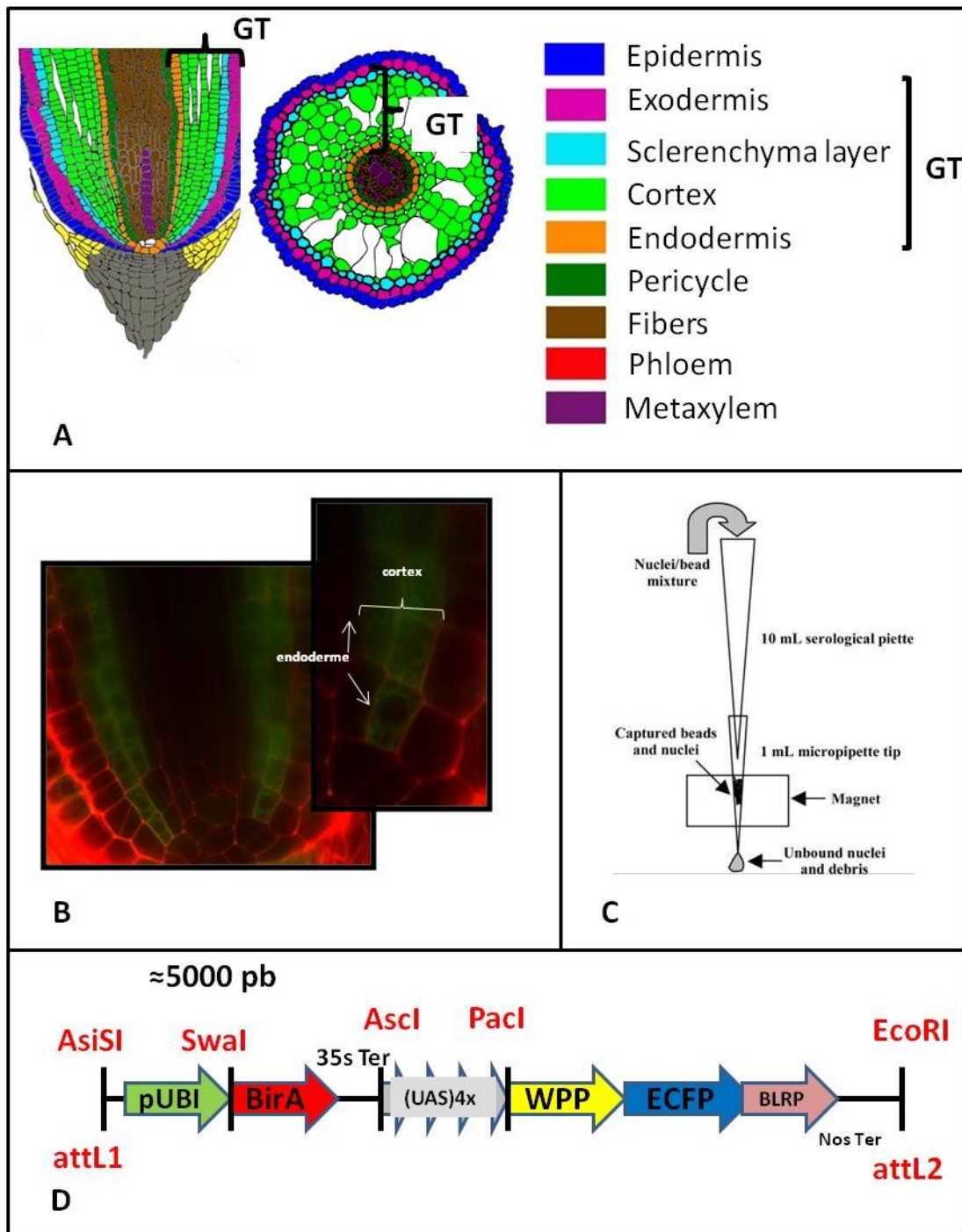


Figure 20: Principe du système INTACT (A) vue schématique des tissus racinaires. GT=tissus internes racinaires (B) Vue longitudinale au multiphoton d'une extrémité de racine d'une lignée enhancer trap avec une expression GFP dans le cortex. L'endoderme ne présente pas de fluorescence. (C) Principe du système INTACT. (D) Construction INTACT qui sera synthétisée.

3.3.3.3 Bioanalyses et expression différentielle entre couches

Nous avons développé différentes bases de données riz au laboratoire [37, 40-43, 92] et afin d'identifier les gènes correspondants aux séquences obtenus par RNAseq, chaque séquence sera cartographiée sur le génome du riz et les annotations correspondantes de chaque unité de transcription extraites. La quantification du niveau d'expression différentielle entre couches sera réalisée en comptant le nombre de séquences appartenant à une même unité de transcription (par exemple une séquence codante) obtenue dans les différentes couches. Les gènes différentiellement exprimés entre couches seront extraits. Parmi les gènes qui seront identifiés, la majorité ne sera en fait impliquée que dans les processus terminaux de différenciation de chaque couche. Par exemple, il est probable que de nombreux gènes intervenant dans la lignification et la différenciation de la paroi secondaire soient exprimés majoritairement dans le sclérenchyme, ce tissu étant très lignifié. Deux cribles successifs seront appliqués pour identifier, parmi la liste totale, les gènes clefs. Seuls les facteurs de transcription, les récepteurs de type kinases à domaine riche en leucine, les petits peptides susceptibles d'agir comme ligands dans les processus de reconnaissance cellule à cellule et les miRNA seront retenus. Ces classes de gènes jouent très fréquemment le rôle de gène maître dans les processus développementaux.

Un deuxième crible, développemental et biologique, sera appliqué. Les gènes les plus en amont impliqués dans la mise en place et la différenciation des tissus internes sont transcrits en premier lors de la mise en place des racines, en particulier pour structurer le méristème. Nous disposons d'un système où nous pouvons induire la formation de racines chez le riz. Ceci permettra de comparer dans le temps le profil d'expression des gènes issus du crible primaire, de déterminer leur séquence et leur importance dans le processus de formation des tissus racinaires. Le système d'induction des racines a été mis au point au laboratoire. Des lignées complétant la mutation CRL1 (crown rootless1) du riz ont été produites et utilisées récemment [90]. Cette mutation est responsable de l'absence totale de racines adventives qui sont normalement produites au cours du développement chez le riz. Il est possible de restaurer la fonction du gène de façon inductible par la dexaméthasone chez des lignées *cr1* complétées que nous avons produites ce qui permet d'induire la formation de racines adventives qui émergent 5 jours après traitement. Une série de prélèvements après induction sera effectuée afin de réaliser une série de PCR quantitatives pour l'ensemble des gènes candidats identifiés au terme du crible primaire, ce qui permettra de les ordonner et de préciser leur importance.

3.3.4 Les acteurs clefs de la différenciation radiale : communications cellule à cellule

Quelles sont les voies de passage de ces signaux locaux ? En théorie il existe deux voies de passages principales chez les plantes. Des signaux moléculaires peuvent être échangés par endocytose et exocytose. Des molécules cargos sont adressées à des vésicules sécrétoires qui fusionnent à la membrane plasmique et leur contenu est déversé par exocytose dans l'apoplaste [93]. Les cellules adjacentes absorbent ces contenus déversés dans l'apoplaste par endocytose. Une autre voie est formée par le transport symplastique où les contenus cellulaires de plusieurs cellules sont mis en communication grâce aux plasmodesmes (PD) [94]. Les PD sont des canaux membranaires qui connectent les cellules adjacentes créant un continuum symplastique. Des molécules peuvent alors diffuser par ces plasmodesmes et il existe maintenant de nombreuses évidences que des signaux variés empruntent les plasmodesmes et qu'il existe un système moléculaire sophistiqué qui facilite ce passage [94]. Plusieurs mutants affectés dans la formation ou la régulation de leur taille d'exclusion présente des perturbations importantes dans la structuration des organes ou la différenciation cellulaire. Enfin, il a été mis en évidence l'implication de chaperones, plus spécifiquement d'une sous-unité d'une chaperone (CCT8) impliqué dans le passage d'un FT, KNOTTED1, à travers les plasmodesmes foliaires [95]. Par ailleurs, il a été postulé que le gène SCZ, une HSP90-like, aurait un rôle de chaperone permettant/facilitant le passage de plusieurs signaux de différenciation [96]. Cette fonction moléculaire postulée permettrait d'expliquer les phénotypes d'identité mêlée observés pour de nombreux tissus racinaires observés dans le mutant perte de fonction [97-99].

La diminution de l'ouverture des PD grâce à l'expression tissu spécifique d'un allèle semi-dominant de callose synthase (CALS3m) réduit voire bloque le passage par exemple de SHR de la stèle vers l'endoderme mimant un phénotype *shr* [100]. De même, le mouvement rétrograde du miR166/165 de l'endoderme où il est induit par SHR vers la stèle est bloqué par l'expression de CALS3m [100]. Ces résultats démontrent que les plasmodesmes jouent un rôle clef dans la mobilité des signaux de différenciation locaux et confirment que SHR et miR166 empruntent les plasmodesmes pour circuler de couche à couche [100]. Enfin, de nouveaux éléments de la machinerie permettant la mobilité de nombreux FT clefs de la différenciation cellulaire racinaires ont été mis en évidence récemment comme le gène SIEL [101].

3.3.4.1 Isoler les signaux de différenciation en bloquant les PD

Si nous souhaitons identifier les signaux réciproques échangés entre l'épiderme et l'exoderme qui conduisent à leur spécification et/ou leur différenciation, une analyse transcriptomique par couche à l'aide du système INTACT nous fournira ces signaux échangés mais également l'ensemble des gènes effecteurs de différenciation soit sans doute plusieurs centaines, voir milliers de gènes différentiellement exprimés entre ces 2 couches. Comment procéder pour identifier spécifiquement ces signaux émis par chaque couche et responsables de leur différenciation et qui correspondent aux signaux de position existant ?

Récemment, un système inductible (système XVE estradiol) utilisant un promoteur stèle spécifique (pWOL) et deux allèles semi-dominants de la CALLOSE SYNTHASE 3 (CALS3) a permis de bloquer les PD [101]. Sous contrôle de l'estradiol la callose s'accumule autour des plasmodesmes dans les cellules de la stèle bloquant le mouvement par exemple de SHR de la stèle vers l'endoderme [101]. Le système est réversible simplement en arrêtant le traitement le promoteur pWOL peut-être remplacé par n'importe quel autre promoteur spécifique, y compris par un penta ou heptamère UAS [101].

La beauté de ce système est qu'il devrait permettre d'identifier une partie des signaux échangés entre deux couches cellulaires. En effet, si on combine le FACS par exemple pour l'exoderme et le système CALS3m nous pouvons bloquer les PD soient dans l'ensemble des couches de la racine soit de manière spécifique dans l'épiderme. Un transcriptome différentiel de l'exoderme avant induction du système XVE et 12h après nous permettrait d'identifier les ARNm et les miRNA mobiles de l'épiderme vers l'exoderme. La combinaison du système INTACT et du système XVE CALS3m pourrait être envisagé pour les miRNA et les protéines mobiles, si le système est suffisamment sensible. Les ARNm mobiles ne pourront être identifiés par cette approche car le système INTACT permet d'isoler uniquement les noyaux marqués et le contenu cytoplasmique est perdu. Une approche FACS permettra peut-être de contourner le problème en récupérant ce contenu cytoplasmique.

3.4 Cellules souches et tissus internes : plasticité phénotypique

Comment sont contrôlées les réponses adaptatives racinaires au niveau des tissus internes ? En particulier, comment est contrôlé le nombre et le statut des cellules souches des tissus internes et le diamètre racinaire ? Est-ce une régulation hormonale et/ou nutritionnelle ? A l'aide de mutants affectés dans la réponse ou la biosynthèse hormonale (GA, Auxine, ABA, éthylène) et les connaissances accumulées sur les réseaux de gènes intervenant dans la mise en place et le nombre des cellules souches des tissus internes obtenues, je me propose d'explorer l'origine des réponses adaptatives racinaires.

3.4.1 Rôle de l'auxine dans l'apparition de grandes versus petites racines latérales

Comment est déterminé le type de racine latérale et quel est le lien entre auxine et type de latérale ? De nombreux résultats, indirects et connus depuis longtemps suggèrent qu'il existe un lien entre auxine, taille des primordia des racines latérales et apparition de grandes versus petites latérales. La mort des apex des racines primaires induits tout d'abord la formation de plusieurs grandes latérales au niveau du méristème basal. Les grandes racines latérales apparaissent principalement et majoritairement au niveau des zones de courbure des racines principales, en raison d'une modification du transport polarisé d'auxine (PAT) lors de la réponse gravitropique de la racine principale. Les petites latérales elles apparaissent régulièrement le long des racines principalement et sont de loin les plus nombreuses dans un rapport de 50 à 1 voir 100 à 1.

L'ensemble de ces résultats suggère l'hypothèse d'un mécanisme d'apparition des grandes latérales similaire à la mise en place des racines latérales chez *A. thaliana*. Le priming interviendrait au niveau du méristème basal et par défaut, si le niveau d'auxine au niveau des cellules fondatrices reste en dessous d'un niveau seuil, seul des primordia de petites racines latérales seraient initiées. Si, par exemple en raison d'une accumulation d'auxine due à une réorientation gravitropique d'une racine principale, le niveau d'auxine des cellules fondatrices dépasse ce même seuil, alors un primordia de grande latérale est initié.

Je me propose d'examiner ce rôle de l'auxine chez le riz dans la mise en place et la structuration des méristèmes de racines latérales grâce à une approche pharmacologique et différents mutants disponibles au laboratoire (Ostir1, Ospin1.1, Ostpl) ainsi que deux senseurs d'auxine déjà disponibles grâce à une future collaboration avec M. Ingouff (senseur DR5 ::mCherry2X) et T. Vernoux (senseur DII) [102]..

La démonstration de la liaison entre niveau d'auxine et type de racine latérale initiée sera apportée grâce au système inductible permettant une synthèse locale d'auxine grâce au système *iaaM* préalablement utilisé chez *A. thaliana* [80]. Dans ce système, il est possible de stimuler la production d'auxine dans des cellules individuelles en réponse à un choc thermique [80]. Brièvement, le système comprend un gène de recombinaison *cre* induit par un choc thermique et qui crée des secteurs clonaux qui expriment simultanément l'*iaaM* (pour indoleacetic acid tryptophan monooxygenase) et un senseur d'auxine couplé au gène rapporteur *GUS* [80]. En ajoutant du Tryptophane au milieu, ces secteurs sont capables de métaboliser de l'auxine. Ce système permet à la fois de contrôler la synthèse d'auxine de manière inductible et également de visualiser cette production d'auxine. Enfin, ce système sera également utilisé avec les différents mutants dans *OsSHR1*, *OsSHR2* afin de déterminer si les différences de diamètre induits par des concentrations locales en auxine au niveau des cellules fondatrices passent par la surexpression de *OsSHR1* définissant un réseau lien auxine, diamètre, contrôle des divisions de la CEEID, *OsSHR* et type de ramification latérale.

3.4.2 Origines nutritionnelles et/ou hormonales des différences de diamètre racinaires

Il existe une variation du diamètre racinaire des racines coronaires qui dépend du nœud d'émergence des racines coronaires et qui passe par un maximum pour l'entrenœud n°9. Par ailleurs, des études anciennes *in vitro* ont établi que le nombre de couches de cortex de racines primaires était lié au statut nutritionnel du milieu chez la tomate [103]. Le diamètre racinaire et la vitesse de croissance sont corrélés au niveau de glucose dans le milieu nutritif. Enfin, une cycline D, *CYCD6;1* est impliquée dans le contrôle des divisions formatives. Cette cycline permet de relier *AtSHR* et les divisions asymétriques de la CEID qui forment le cortex chez *A. thaliana* [104]. Les cyclines D sont en particulier régulées par le glucose et statuts carboné de la plante suggérant une hypothèse pour expliquer les différences de diamètres racinaires chez le riz à travers le niveau de carbone et la compétition entre sources et puits, les différentes racines coronaires jouant le rôle de puits en compétition pour le glucose circulant. Les diamètres respectifs seraient alors les résultants des équilibres entre ces différents puits et les sources. L'analyse de mutants impliqués dans le fonctionnement de ces cyclines, ainsi que l'analyse de lignées rapportrices utilisant les promoteurs de ces cyclines permettra d'établir si le lien supposé existe. Le système à 2 composants, qui permet de simuler une alimentation riche en glucose dans le scutellum et pauvre dans le système racinaire sera mis à profit pour tester le lien source puits et diamètre racinaire chez le riz.

Les mutants et lignées rapportrices seront également utilisées avec ce système expérimental. Enfin, le lien entre glucose et son rôle comme signal et/ou métabolite sera étudié grâce à des expériences pharmacologiques et différents mutants. Le lien entre *SHR* et glucose sera exploré grâce au matériel qui a été ou qui sera développé (lignées KO, surexprimeurs, lignées inductibles...).

3.4.3 Réponses adaptatives cellulaires spécifiques des tissus internes racinaires

A l'aide de la stratégie INTACT qui sera développé, les réponses à un stress salin au niveau tissu spécifique seront explorées. Les réponses adaptatives au niveau cellulaire sont peu connues et en particulier les réponses développementales et anatomiques. Le projet ANR Bioadapt cherche en partie à répondre à ces questions. Cette approche est complètement exploratoire. Nous rechercherons à relier les réseaux impliqués dans la mise en place des tissus internes et la réponse adaptative de ces mêmes tissus. Il est possible que ces réponses adaptatives soient totalement différentes. Cet ANR sera l'occasion de tester ces différentes hypothèses.

3.5 Vers la biologie des systèmes: modélisation et sélection

A terme, une approche de biologie des systèmes sera nécessaire pour intégrer les différents niveaux d'observations obtenus qu'il s'agisse de données transcriptomiques, des régulations croisés des gènes impliqués dans la formation des GT en réponse à l'auxine ou au statut carboné etc... La modélisation de ces réseaux de gènes permettra à la fois de tester la cohérence du système/modèle proposé, de faire des prédictions moléculaires mais également de tester l'impact de ces variations pour la structure/morphologie racinaire. Dans les deux facettes de l'approche biologie système, nous serons principalement des producteurs de « données » et la partie modélisation sera faite à travers des collaborations par exemple avec l'équipe Virtual Plant qui possède déjà une solide expertise dans la modélisation des réseaux de gènes et du développement végétal à différentes échelles. Il existe également plusieurs équipes en France qui sont engagés dans cette approche, à Montpellier les équipes D'A. Gojon à BPMP et de Laurent Laplaze à DIADE et à l'ENS Lyon T. Vernoux et I. Traas qui pourront nous faire profiter de leurs expériences.

Les données de re-séquençage massif de cultivars de riz et les nombreux travaux de génétique d'association vont également fournir des quantités considérables d'informations. Les études de génétique d'association utilisant un panel de cultivars permettront de vérifier si une part importante de la variation naturelle pour des caractères architecturaux et anatomiques est reliée à des variations de séquences dans certains des membres des réseaux que je me propose d'étudier. A plus long terme il sera peut-être même envisageable de modéliser et de prédire des idéotypes racinaires en reliant diversité génétique et biologie des systèmes. A plus court terme, des allèles rares favorables seront recherchés par tilling ou par Ecotilling lorsque des hypothèses mécanistiques auront été validées. Au final, il s'agira de développer de nouvelles variétés plus spécifiquement adaptés à certains agroenvironnements en ciblant des modifications architecturales ou anatomiques adaptatives. La même stratégie pourra être utilisée si les conditions environnementales changent ou s'il s'agit de développer de nouvelles variétés pour de nouveaux environnements.

4 Curriculum vitae

Christophe PERIN

CIRAD BIOS
UMR TGU INRA/CIRAD /SUPAGRO
Avenue Agropolis TA A96/03 Desk 54
34398 Montpellier Cedex 5 FRANCE

Téléphone: 33(0)4 67617185

Fax: 33(0)467615605

Email :perin@cirad.fr

Nationalité: Française

Age : 40 ans

Vie Maritale

Deux enfants de 12 et 7 ans

Formation

Doctorat d'Université, Génétique Moléculaire des Plantes 2000 Université de la Méditerranée, Marseille Lumigny, France

DEA de Génétique, 1996, INAPG Université Paris VI et Paris XI, France

Maîtrise de Biologie Végétale, 1994, Université de Bourgogne, France

Parcours professionnel

Depuis 2002 : Chercheur en biologie du développement racinaire du riz, CIRAD

2001-2002 : Stage postdoctoral : (Pierre Richaud, Alain Vavasseur CEA Cadarache FRANCE)

Caractérisation fonctionnelle d'un transporteur de type Cd-ATPase chez *Arabidopsis thaliana*

2000-2001 : Stage postdoctoral: (Jim Giovannoni BTI For Plant Research, Cornell USA)

Comparative genomics of MADS-box gene family in *Lycopersicon esculentum*

1997-2000 : Thèse (M. Pitrat, C. Dogimont, M. Causse INRA Avignon (84), France)

Construction d'une carte génétique de référence de *Cucumis melo* et contrôle génétique du développement et de la maturation du fruit

1996 : Stage (6 mois) de DEA (M. Zivy, INRA Ferme du Moulon Orsay France) sur les protéines pariétales de maïs induites en réponse à un stress hydrique

1995 : Stage (2 mois) de maîtrise au Laboratoire de l'INRA de Dijon sur la diversité moléculaire des endomycorhizes du genre *Glomus* (Pr H. Duliéu)

Thèmes de recherches

Génétique moléculaire du développement racinaire du riz : identification, caractérisation de réseaux de gènes intervenant dans la différenciation, la mise en place des tissus internes racinaires. Génomique du riz, Bioinformatique, imagerie et ingénierie génétique

Participation à des projets nationaux et internationaux

ANR Génoplane RLKome, ANR Génoplane FROG, Projet CEDROME, Projet GCP Phylogenomics, Projet ATP CIRAD Arpege, Projet ATP CIRAD Meristem, Projet ATP Oryzon, Projet Genoscope ARAWAK, Projet ANR blanc Osmir, Projet Agropolis Rhyzopolis

Dépôt de projets nationaux et internationaux comme coordinateur

Projet RARE Chercheurs d'Avenir (2011), région Languedoc-Roussillon, Projet ANR Bioadapt ROSASS (2011), projet FIRST Cariplo CESARI Agropolis Fondation

Prix

Lauréat d'une bourse Postdoctorale Lavoisier du Ministère des Affaires Etrangères en 2000-2001

Activités de referee pour divers journaux scientifiques

PLOS ONE (1), Theoretical and Applied Genetics (1), BMC Evolutionary Biology (1), Bioinformatics (1), Journal of Experimental Biology (2), Nucleic Acids Research (2), Plant Cell Reports (2), Plant Molecular Biology (1), Plant Science (4)

Activités de vulgarisation

Y. Coudert, C. Périn, B. Courtois, N. G. Khong and P. Gantet. 2010. Le riz vers des variétés mieux adaptées. Pour la Science

Comités

Comité ANR Génoplate Nouveaux outils, Membre EPSO, Membre EFOR

Participation à des colloques

Dievart A., Perin C., Brasileiro A.C.M., Gantet P., Breitler J.C., Larmande P., Lorieux M., Droc G., Pereira A., Guiderdoni E. 2007. Applying reverse genetics strategies to rice mutant resources for deciphering developmental and adaptive processes. [P2-07] [Abstract]. 5th International Rice Genomics Symposium, Tsukuba, Japan, October 15-17, 2007. s.l. : s.n., [2] p. International Rice Functional Genomics Symposium. 5, 2007-10-15/2007-10-17, Tsukuba, Japon.

Perin C., Rebouillat J., Brasileiro A.C.M., Dievart A., Gantet P., Breitler J.C., Johnson A.A.T., Courtois B., Ahmadi N., De Raïssac M., Luquet D., Conte M., This D., Pati P.K., Le Q.H., Meynard D., Verdeil J.L., Guiderdoni E. 2007. Novel insights into the genomics of rice root adaptive development. In : Brar Darshan S. (ed.), Mackill David J. (ed.), Hardy Bill (ed.). Rice genetics V : Proceedings of the fifth international rice genetics symposium, Manila, Philippines, 19-23 November 2005. Londres : World Scientific, p. 117-141 International Rice Genetics Symposium. 5, 2005-11-19/2005-11-23, Manille, Philippines.

Dievart A., Droc G., Perin C., Shiu S.H., Guiderdoni E. 2005. Functional leucine-rich repeat receptor-like kinase proteins in rice : [P296]. [Poster abstract]. In : IRRI. 5th International Rice Genetics Symposium (A platform for exploring developments in rice genetics and their applications) and 3rd International Rice Functional Genomics Symposium. Abstract . Manila : IRRI, p. 203 International Rice Genetics Symposium. 5, 2005-11-19/2005-11-23, Manille, Philippines.

Droc G., Ruiz M., Larmande P., Pereira A., Piffanelli P., Morel J.B., Dievart A., Courtois B., Guiderdoni E., Perin C. 2005. OryGenesDB: A database for rice reverse genetics : [P355].

[Poster abstract]. In : IRRI. 5th International Rice Genetics Symposium (A platform for exploring developments in rice genetics and their applications) and 3rd International Rice Functional Genomics Symposium. Abstract . Manila : IRRI, p. 234 International Rice Genetics Symposium. 5, 2005-11-19/2005-11-23, Manille, Philippines.

5 Publications

5.1 Bilan synthétique

20 publications dans des revues de rang A depuis 2000.

Revue	nombre	Ordre	Impact factor
Trends in Plant Science	1		10.1
Nucleic Acids Research	5	D2	7.8
Plant Journal	1		6.9
Plant Physiology	1	P	6.4
Plant Biotechnology Journal	1		4.9
Plant and Cell Physiology	1		4.2
BMC Genomics	1	D	4.2
Developmental Biology	1	D	4.1
BMC Evolutionary Biology	1	D	3.7
Theoretical and Applied Genetics	2	P	3.3
Rice	1	D	2.9
Molecular Genetics Genomics	1	P	2.4
Functional Plant Biology	1		2.1
Genome	1		1.7
Biotechnology and Genetic Engineering Reviews	1		0.9

5.2 Liste des publications dans des revues de rang A

- 1: Dievart A., Gilbert N., Droc G., Attard A., Gourgues M., Guiderdoni E. and Perin C.
Leucine-Rich Repeats Receptor Kinases are sporadically distributed in eukaryotic genomes
BMC Evol Biol. 2011 Dec 20;11:367
- 2: Pauluzzi G., Divol F., Puig J., Guiderdoni E., Dievart A. and Perin C.
Surfing along the root ground tissue gene network
(in press in *Developmental Biology*)
- 3: Lorieux M., Blein M., Lozano J., Bouniol M., Droc G., Diévert A., Périn C., Mieulet D., Lanau N., Bès M., Rouvière C., Gay C., Piffanelli P., Larmande P., Guerin V., Chalvon V., Michel C., Barnola C., Biderre-Petit C., Sallaud C., Perez P., Bourgis F., Ghesquière A., Gantet P., Tohme J., Morel J.B., and Guiderdoni E.
In-depth molecular and phenotypic characterization in a rice insertion line library facilitates gene identification through reverse and forward genetics approaches
(in press in *Plant Biotechnology Journal*)
- 4: Rouard M., Guignon V., Aluome C., Laporte MA., Droc G., Walde C., Zmasek CM., Perin C. And Conte MG.
GreenPhylDB v2.0: comparative and functional genomics in Plants
Nucleic Acids Res. 2011 Jan;39(Database issue):D1095-102.
- 5: Lin S., Santi C., Jobet E., Lacut E., Karlowski WM., Verdeil JL., Breitler JC, Christophe Périn C., Ko SS., Guiderdoni E., Chiou TJ., and Echeverria M.
Complex regulation of two target genes encoding SPX-MFS proteins by rice miR827 in response to phosphate starvation
Plant and Cell Physiology 2010 Dec;51(12):2119-31
- 6: Y. Coudert, C. Périn, B. Courtois, N. G. Khong and P. Gantet
Genetic control of root development in rice, the model cereal
Trends Plant Sci. 2010 Apr;15(4):219-26
- 7 : G. Droc, C. Périn, S. Fromentin and P. Larmande
OryGenesDB 2008 update: Towards database interoperability for functional genomics of rice
Nucleic Acids Res. 2009 Jan;37(Database issue):D992-5.
- 8: J. Rebouillat, A. Dievart, JL. Verdeil, J. Escoute, G. Giese, JC. Breitler, P. Gantet, S. Espeout, E. Guiderdoni and C. Périn
Molecular genetics of rice root development
Rice vol 2, Number 1/Mars 2009 15-34
- 9: MG Conte, S. Gaillard, M. Rouard and C. Périn
Phylogenomics of plant genomes: a methodology for genome-wide searches for orthologs in plants.
BMC Genomics 9:183
- 10: MG. Conte, S. Gaillard, N. Lanau, M. Rouard and C. Périn
GreenPhylDB: a database for plant comparative genomics

Nucleic Acids Res. 2008 Jan;36(Database issue):D991-8. Epub 2007 Nov 5

11 : P. Larmande, C. Gay, M. Lorieux, C. Périn, M. Bouniol, G. Droc, C. Sallaud, Pascual Perez, I. Barnola, C. Biderre-Petit, J. Martin, J. B. Morel, A. A.T. Johnson, F. Bourgis, A. Ghesquière, M. Ruiz, B. Courtois and E. Guiderdoni

Oryza Tag Line, a phenotypic mutant database for the Génoplante rice insertion line library

Nucleic Acids Res. 2008 Jan;36(Database issue):D1022-7. Epub 2007 Oct 18

12: D. Luquet, D, Y. H. Song, S. Elbelt, D. This C, A. Clement-Vidal, C. Périn, D. Fabre and M. Dingkuhn (2007)

Model-assisted physiological analysis of Phyllo, a rice architectural mutant

Functional Plant Biology, 2007, **34**, 11–23

13: G. Droc, M. Ruiz, P. Larmande, A. Pereira, P. Piffanelli, J. B. Morel, A. Dievart, B. Courtois, E. Guiderdoni and C. Périn (2006)

OryGenesDB: a database for rice reverse genetics.

Nucleic Acids Research Jan 1;34 (Database issue):D736-40.

14: Sallaud C, Gay C, Larmande P, Bes M, Piffanelli P, Piegu B, Droc G, Regad F, Bourgeois E, Meynard D, Périn C, Sabau X, Ghesquiere A, Glaszmann JC, Delseny M, Guiderdoni E. (2004)

High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics.

Plant J. 2004 39(3):450-64.

15: Silberstein L, Kovalski I, Brotman Y, Périn C, Dogimont C, Pitrat M, Klingler J, Thompson G, Portnoy V, Katzir N, Perl-Treves R. (2003)

Linkage map of Cucumis melo including phenotypic traits and sequence-characterized genes.

Genome. 2003 46(5):761-73.

16: Brotman Y, Silberstein L, Kovalski I, Périn C, Dogimont C, Pitrat M, Klingler J, Thompson A, Perl-Treves R. (2002)

Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance.

Theor Appl Genet. 104(6-7):1055-1063.

17 : Périn C, Gomez-Jimenez M, Hagen L, Dogimont C, Pech JC, Latche A, Pitrat M, Lelievre JM. (2002)

Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit.

*Plant Physiol.*129(1):300-9.

18: Périn C, Hagen L, Giovinozzo N, Besombes D, Dogimont C and Pitrat M (2002)

Genetic control of fruit shape acts prior to anthesis in melon (Cucumis melo L.).

Mol. Genet. Genomics 266:933-941.

19: Périn C, Hagen L, De Conto V, Katzir N, Danin-Poleg Y, Portnoy V, Baudracco-Arnas J, Chadeouf J, Dogimont C and Pitrat M. (2002)

A reference map of Cucumis melo based on two recombinant inbred populations.

Theor. Appl. Genet. 104:1017-1034.

5.3 Ouvrages ou chapitre d'ouvrage

1 : Courtois B., Ahmadi N., Perin C., Luquet D., Guiderdoni E. 2009.

The rice root system: from QTLs to genes to alleles

In : Serraj Rachid (ed.), Bennett John (ed.), Hardy B. (ed.). Drought frontiers in rice: crop improvement for increased rainfed production. Singapour : World Scientific Publishing [SG], p. 171-188.

2: Khong N.G., Richaud F., Coudert Y., Pati P.K., Santi C., Perin C., Breitler J.C., Meynard D., Guiderdoni E., Gantet P. 2008.

Modulating rice stress tolerance by transcription factors

In : Ed. by Stephen E. Harding. Biotechnology and genetic engineering reviews. Vol. 25. Nottingham : Nottingham University Press, p. 381-404.

3: Antonio B.A., Buell C.R., Yamazaki Y., Yap I., Perin C., Bruskiewich R..

Informatics resources for rice : Functional genomics 2007.

In : Upadhyaya Narayana (ed.). Rice functional genomics : Challenges, progress and prospects. New York : Springer [Etats-Unis], p. 355-394.

6 Résumé des activités d'encadrement

Depuis 2002 j'ai encadré ou co-encadré 18 personnes dont 2 post-doctorants, 4 thèses, 6 master 2, 1 master 1, 4 assistant ingénieur et 1 scientifique visiteur. La plupart de ces stages ou travaux ont conduits à des publications et/ou rapports de stage. La quasi-totalité des personnes que j'ai encadrés a trouvé du travail en CDI ou a poursuivi son cursus dans le domaine de la recherche. Mes activités d'enseignement se résument à 3h de cours/an en moyenne à l'UM2 et/ou Supagro.

Nom	Niveau	Année	Durée	Situation actuelle
Fanchon Divol	Post-doc	2010-2012	24 mois	Post-doc dans l'équipe
Florence Arthus	Assistant Ingénieur	2009-2012	24 mois	CDD dans l'équipe
Germain Pauluzzi	Thèse	2008-2011	3 ans	Thèse dans l'équipe
Stella Cesari	Master 1	2008	6 mois	Thèse à BGPI
Angélique Laporte	Master 2	2008	6 mois	Thèse à CEFE
Anne Dievert	Master 2	2008	6 mois	CR2 dans l'équipe
Julien Serret	Assistant Ingénieur	2007-2009	18 mois	CDD IRD
Mathieu Peramat	Master 2	2006	6 mois	-
Aurelien Brix	Master 2	2006	6 mois	CDD SSII
Sandra Espeout	Assistant Ingénieur	2005-2007	18 mois	CDI CIRAD
Matthieu Conte	Thèse	2004-2007	3 ans	CDI Chercheur Syngenta
Matthieu Conte	Master 2	2004	6 mois	CDI Chercheur Syngenta
Julia Rebouillat	Thèse	2003-2006	3 ans	CDI Société Hamamatsu
Nadège Lanau	Assistant Ingénieur	2003-2011	8 ans	CDI dans l'équipe
Anna Brasileiro	Visiting Scientist	2003-2006	3 ans	CR1 EMBRAPA Brésil
Fabrice Marger	Master 2	2003	6 mois	Thèse IGF
Anne Dievert	Post-doc	2002-2007	5 ans	CR2 dans l'équipe
Le Quang Hoc	Thèse	2002-2005	3 ans	MC Hanoi Vietnam

7 References

1. Hijri, M. and I.R. Sanders, *Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei*. Nature, 2005. **433**(7022): p. 160-3.
2. Vincent, D., et al., *Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation*. Plant Physiol, 2005. **137**(3): p. 949-60.
3. Riccardi, F., et al., *Protein changes in response to progressive water deficit in maize . Quantitative variation and polypeptide identification*. Plant Physiol, 1998. **117**(4): p. 1253-63.
4. Baudracco-Arnas, S. and M. Pitrat, *A genetic map of melon (Cucumis melo L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers*. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik, 1996. **93**(1/2): p. 57-64.
5. Vos, P., et al., *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(21): p. 4407-14.
6. Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda, *Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification*. Genomics, 1994. **20**(2): p. 176-83.
7. Saliba-Colombani, V., et al., *Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome*. Genome, 2000. **43**(1): p. 29-40.
8. Perin, C., et al., *A reference map of Cucumis melo based on two recombinant inbred line populations*. Theor Appl Genet, 2002. **104**(6-7): p. 1017-1034.
9. Perin, C., et al., *Genetic control of fruit shape acts prior to anthesis in melon (Cucumis melo L.)*. Mol Genet Genomics, 2002. **266**(6): p. 933-41.
10. Sinnott, E.W. and S. Kaiser, *Two Types of Genetic Control Over the Development of Shape*. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 1934. **61**(1): p. 1-7.
11. Wu, S., et al., *SUN regulates vegetative and reproductive organ shape by changing cell division patterns*. Plant Physiol, 2011. **157**(3): p. 1175-86.
12. Tanksley, S.D., *The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato*. Plant Cell, 2004. **16 Suppl**: p. S181-9.
13. Perin, C., et al., *Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit*. Plant Physiol, 2002. **129**(1): p. 300-9.
14. Dogimont, C., et al., *Molecular diversity at the Vat/Pm-W resistance locus in melon*, in *Cucurbitaceae 2008*, M. Pitrat, Editor. 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae: Avignon (France). p. 219-227.
15. Nieto, C., et al., *An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon*. Plant J, 2006. **48**(3): p. 452-62.
16. Martin, A., et al., *A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1135-8.
17. Diaz, A., et al., *A consensus linkage map for molecular markers and quantitative trait loci associated with economically important traits in melon (Cucumis melo L.)*. BMC Plant Biol, 2011. **11**: p. 111.
18. Vrebalov, J., et al., *A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus*. Science, 2002. **296**(5566): p. 343-6.
19. Alvarez-Buylla, E.R., et al., *An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5328-33.
20. Fan, H.Y., et al., *Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins*. Plant J, 1997. **12**(5): p. 999-1010.

21. Theissen, G., J.T. Kim, and H. Saedler, *Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes*. J Mol Evol, 1996. **43**(5): p. 484-516.
22. Ferrandiz, C., S.J. Liljegren, and M.F. Yanofsky, *Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during Arabidopsis fruit development*. Science, 2000. **289**(5478): p. 436-8.
23. Mandel, M.A., et al., *Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1*. Nature, 1992. **360**(6401): p. 273-7.
24. Gu, Q., et al., *The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development*. Development, 1998. **125**(8): p. 1509-17.
25. Pelaz, S., et al., *B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes*. Nature, 2000. **405**(6783): p. 200-3.
26. Fulton, T.M., et al., *Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants*. Plant Cell, 2002. **14**(7): p. 1457-67.
27. Gimenez, E., et al., *Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e14427.
28. Itkin, M., et al., *TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network*. Plant J, 2009. **60**(6): p. 1081-95.
29. Vrebalov, J., et al., *Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the Tomato SHATTERPROOF gene TAGL1*. Plant Cell, 2009. **21**(10): p. 3041-62.
30. Eisen, J.A., *Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis*. Genome Res, 1998. **8**(3): p. 163-7.
31. Eisen, J.A., D. Kaiser, and R.M. Myers, *Gastrogenomic delights: a movable feast*. Nat Med, 1997. **3**(10): p. 1076-8.
32. Lone, M.I., et al., *Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives*. J Zhejiang Univ Sci B, 2008. **9**(3): p. 210-20.
33. Clemens, S., *Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis*. Planta, 2001. **212**(4): p. 475-86.
34. Wong, C.K. and C.S. Cobbett, *HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in Arabidopsis thaliana*. New Phytol, 2009. **181**(1): p. 71-8.
35. Williams, L.E. and R.F. Mills, *P(1B)-ATPases--an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants*. Trends Plant Sci, 2005. **10**(10): p. 491-502.
36. Duby, G. and M. Boutry, *The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles*. Pflugers Arch, 2009. **457**(3): p. 645-55.
37. Droc, G., et al., *OryGenesDB: a database for rice reverse genetics*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D736-40.
38. Vergne, E., et al., *ARCHIPELAGO: a dedicated resource for exploiting past, present, and future genomic data on disease resistance regulation in rice*. Mol Plant Microbe Interact, 2008. **21**(7): p. 869-78.
39. Stein, L.D., et al., *The generic genome browser: a building block for a model organism system database*. Genome Res, 2002. **12**(10): p. 1599-610.
40. Droc, G., et al., *OryGenesDB 2008 update: database interoperability for functional genomics of rice*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D992-5.
41. Conte, M.G., et al., *Phylogenomics of plant genomes: a methodology for genome-wide searches for orthologs in plants*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 183.
42. Conte, M.G., et al., *GreenPhylDB: a database for plant comparative genomics*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D991-8.
43. Rouard, M., et al., *GreenPhylDB v2.0: comparative and functional genomics in plants*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D1095-102.
44. Kafkafi, U., Y. Waisel, and A. Eshel, *Front Matter*, in *Plant Roots*. 2002, CRC Press.

45. Evert, R.F. and K. Esau, *Esau's Plant anatomy : meristems, cells, and tissues of the plant body : their structure, function, and development*. 3rd ed. 2006, Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience. xx, 601 p.
46. Simpson, M.G., *Plant systematics*. 2nd ed. 2010, Burlington, MA: Academic Press. xii, 740 p.
47. Enstone, D., C. Peterson, and F. Ma, *Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2002. **21**(4): p. 335-351.
48. Inan, G., et al., *Salt cress. A halophyte and cryophyte Arabidopsis relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles*. *Plant Physiol*, 2004. **135**(3): p. 1718-37.
49. Coudert, Y., et al., *Genetic control of root development in rice, the model cereal*. *Trends Plant Sci*, 2010. **15**(4): p. 219-26.
50. Rebouillat, J., et al., *Molecular Genetics of Rice Root Development*. *Rice*, 2009. **2**(1): p. 15-34.
51. Pauluzzi, G., et al., *Surfing along the root ground tissue gene network*. *Developmental Biology*, 2011. **accepted for publication**.
52. Di Laurenzio, L., et al., *The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root*. *Cell*, 1996. **86**(3): p. 423-33.
53. Helariutta, Y., et al., *The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling*. *Cell*, 2000. **101**(5): p. 555-67.
54. Kamiya, N., et al., *The SCARECROW gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants*. *Plant J*, 2003. **36**(1): p. 45-54.
55. Cui, H., et al., *An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants*. *Science*, 2007. **316**(5823): p. 421-5.
56. Nakajima, K., et al., *Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning*. *Nature*, 2001. **413**(6853): p. 307-11.
57. Sena, G., J.W. Jung, and P.N. Benfey, *A broad competence to respond to SHORT ROOT revealed by tissue-specific ectopic expression*. *Development*, 2004. **131**(12): p. 2817-26.
58. Itoh, J., et al., *Rice plant development: from zygote to spikelet*. *Plant Cell Physiol*, 2005. **46**(1): p. 23-47.
59. Pauluzzi, G., et al., *Overexpression of OsSHR1 and OsSHR2 induce supernumerary ground tissue cell layers and suggest level of SHR transcript in stele determine the number of root cortex cell layers in rice in preparation*, 2011.
60. Campilho, A., et al., *Time-lapse analysis of stem-cell divisions in the Arabidopsis thaliana root meristem*. *Plant J*, 2006. **48**(4): p. 619-27.
61. Dolan, L., et al., *Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root*. *Development*, 1993. **119**(1): p. 71-84.
62. Moscou, M.J. and A.J. Bogdanove, *A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors*. *Science*, 2009. **326**(5959): p. 1501.
63. Boch, J., et al., *Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors*. *Science*, 2009. **326**(5959): p. 1509-12.
64. Morbitzer, R., et al., *Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(50): p. 21617-22.
65. Mahfouz, M.M., et al., *De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(6): p. 2623-8.
66. Li, T., et al., *TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(1): p. 359-72.
67. Defrancesco, L., *Move over ZFNs*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(8): p. 681-4.
68. Weber, E., et al., *Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning*. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19722.

69. Morbitzer, R., et al., *Assembly of custom TALE-type DNA binding domains by modular cloning*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(13): p. 5790-9.
70. Terada, R., et al., *Gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics*. Plant Physiol, 2007. **144**(2): p. 846-56.
71. Li, T., et al., *Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(14): p. 6315-25.
72. Traas, J., et al., *Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands*. Nature, 1995. **375**(6533): p. 676-677.
73. Torres-Ruiz, R.A. and G. Jurgens, *Mutations in the FASS gene uncouple pattern formation and morphogenesis in Arabidopsis development*. Development, 1994. **120**(10): p. 2967-78.
74. Webb, M., et al., *Cell specification in the Arabidopsis root epidermis requires the activity of ECTOPIC ROOT HAIR 3--a katanin-p60 protein*. Development, 2002. **129**(1): p. 123-31.
75. van den Berg, C., et al., *Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signalling*. Nature, 1995. **378**(6552): p. 62-5.
76. van den Berg, C., et al., *Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem*. Nature, 1997. **390**(6657): p. 287-9.
77. Blilou, I., et al., *The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots*. Nature, 2005. **433**(7021): p. 39-44.
78. Ding, Z. and J. Friml, *Auxin regulates distal stem cell differentiation in Arabidopsis roots*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 12046-51.
79. Grieneisen, V.A., et al., *Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth*. Nature, 2007. **449**(7165): p. 1008-13.
80. Dubrovsky, J.G., et al., *Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(25): p. 8790-4.
81. Swarup, R., et al., *Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(11): p. 1057-65.
82. Sallaud, C., et al., *High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics*. Plant J, 2004. **39**(3): p. 450-64.
83. Johnson, A.A., et al., *Spatial control of transgene expression in rice (Oryza sativa L.) using the GAL4 enhancer trapping system*. Plant J, 2005. **41**(5): p. 779-89.
84. Deal, R.B. and S. Henikoff, *The INTACT method for cell type-specific gene expression and chromatin profiling in Arabidopsis thaliana*. Nat Protoc, 2011. **6**(1): p. 56-68.
85. Deal, R.B. and S. Henikoff, *A simple method for gene expression and chromatin profiling of individual cell types within a tissue*. Dev Cell, 2010. **18**(6): p. 1030-40.
86. Iyer-Pascuzzi, A.S. and P.N. Benfey, *Fluorescence-activated cell sorting in plant developmental biology*. Methods Mol Biol, 2010. **655**: p. 313-9.
87. Kerk, N.M., et al., *Laser capture microdissection of cells from plant tissues*. Plant Physiol, 2003. **132**(1): p. 27-35.
88. Nakazono, M., et al., *Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize*. Plant Cell, 2003. **15**(3): p. 583-96.
89. Rensink, W.A. and C.R. Buell, *Arabidopsis to rice. Applying knowledge from a weed to enhance our understanding of a crop species*. Plant Physiol, 2004. **135**(2): p. 622-9.
90. Coudert, Y., et al., *Transcript profiling of crown rootless1 mutant stem base reveals new elements associated with crown root development in rice*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 387.
91. Cloonan, N. and S.M. Grimmond, *Transcriptome content and dynamics at single-nucleotide resolution*. Genome Biol, 2008. **9**(9): p. 234.
92. Larmande, P., et al., *Oryza Tag Line, a phenotypic mutant database for the Genoplante rice insertion line library*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D1022-7.
93. Zarsky, V., et al., *Exocytosis and cell polarity in plants - exocyst and recycling domains*. New Phytol, 2009. **183**(2): p. 255-72.

94. Lucas, W.J., B.K. Ham, and J.Y. Kim, *Plasmodesmata - bridging the gap between neighboring plant cells*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(10): p. 495-503.
95. Xu, X.M., et al., *Chaperonins facilitate KNOTTED1 cell-to-cell trafficking and stem cell function*. Science, 2011. **333**(6046): p. 1141-4.
96. Doerner, P., *Plant development: confused root cells have mixed identity in SCHIZORIZA*. Curr Biol, 2010. **20**(5): p. R246-8.
97. Mylona, P., et al., *SCHIZORIZA controls an asymmetric cell division and restricts epidermal identity in the Arabidopsis root*. Development, 2002. **129**(18): p. 4327-34.
98. Pernas, M., E. Ryan, and L. Dolan, *SCHIZORIZA controls tissue system complexity in plants*. Curr Biol, 2010. **20**(9): p. 818-23.
99. ten Hove, C.A., et al., *SCHIZORIZA encodes a nuclear factor regulating asymmetry of stem cell divisions in the Arabidopsis root*. Curr Biol, 2010. **20**(5): p. 452-7.
100. Vaten, A., et al., *Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development*. Dev Cell, 2011. **21**(6): p. 1144-55.
101. Koizumi, K., et al., *An Essential Protein that Interacts with Endosomes and Promotes Movement of the SHORT-ROOT Transcription Factor*. Curr Biol, 2011.
102. Brunoud, G., et al., *A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution*. Nature, 2012. **482**(7383): p. 103-6.
103. Heimsch, C., *A New Aspect of Cortical Development in Roots*. American Journal of Botany, 1960. **47**(3): p. 195-201.
104. Sozzani, R., et al., *Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth*. Nature, 2010. **466**(7302): p. 128-32.